

# **Systemische Wirkung sezernierter Sphingomyelinase bei Entzündung**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Daniel Hupe**

**geboren am 17.07.1981 in Leinefelde**

## Gutachter

- |  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. Univ.-Prof. Dr. med. Michael Bauer, | KAI-Universitätsklinikum Jena |
| 2. Univ.-Prof. Dr. med. R. W. Kinne,   | Universitätsklinikum Jena     |
| 3. Prof. Dr. med. Erich Gulbins,       | Universitätsklinikum Essen    |

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.11.2008

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Inflammationsreaktion	1
1.2. Systemische Inflammationsreaktion	2
1.3. SIRS und Sepsis	3
1.4. Das Makrophagenaktivierungssyndrom als Beispiel systemischer Inflammation	4
1.5. Die Biochemie der Sphingolipide als bedeutende Membranlipide	5
1.6. Sphingomyelinasen	8
1.7. Die lysosomale und sezernierte Isoform der sauren Sphingomyelinase	9
1.8. Stimulation und Inhibition der sauren Sphingomyelinase	11
1.9. Das Endothel als zentrales Organ inflammatorischer Prozesse	12
1.10. Biochemische Membranveränderungen: Dynamik Ceramid-reicher <i>rafts</i>	14
<b>2. Zielsetzung und Hypothese</b>	<b>15</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1. Verwendete Materialien	17
3.2. Verwendete Geräte und Software	17
3.3. Verwendete Lösungen und Medien	18
3.4. Versuchsdurchführung	19
3.4.1. HMEC-1 Zellkultivierung	19
3.4.2. Metabolisches Labelling von HMEC-1 mit C <sub>6</sub> -NBD-Sphingomyelin	19
3.4.3. Charakteristik und Aufbereitung von Patientenserum und Kontrollserum	20
3.4.4. Endothelzellstimulationsversuch mit Serum septischer Patienten	21
3.4.5. Inhibitorstudien der Endothelzellstimulation	21

3.4.6. Serumaktivitätsbestimmung der sSMPD1 .....	22
3.4.7. Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie .....	22
<b>3.5. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen</b>	
<b>stimulierter Endothelzellen</b> .....	24
3.5.1. Verwendete Antikörper .....	24
3.5.2. Antikörperstaining von Endothelzellepitopen.....	26
<b>3.6. Statistische Auswertung und Ergebnispräsentation</b> .....	28
3.6.1. Statistische Tests .....	28
3.6.2. Ergebnispräsentation .....	29
<b>4. Ergebnisse.</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1. Voruntersuchungen</b> .....	30
4.1.1. Aktivitätsbestimmung der SMPD1 anhand Ceramidquantifizierung .....	31
4.1.2. Auswertung spezifischer DC-Sphingolipidmuster.....	31
<b>4.2. Untersuchungen der Serumaktivität der sSMPD1</b> .....	35
4.2.1. Aktivität sezernierter Sphingomyelinase bei Patienten mit Sepsis .....	35
4.2.2. Einzelfallstudie zum Makrophagenaktivierungssyndrom-	
Die sSMPD1 im Kontext zu weiteren Entzündungsmarkern.....	36
<b>4.3. Stimationsversuche am Endothelzellmodell</b> .....	38
4.3.1. Zeitabhängige Dynamik SMPD1-induzierter	
Sphingomyelin-Hydrolyseprodukte .....	38
4.3.2. Inhibitorstudien der Endothelzellstimulationsversuche .....	40
4.3.3. Serumcharakterisierung am Modell C <sub>6</sub> -NBD-Sphingomyelin-	
markierter Endothelzellen .....	45
<b>4.4. Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung des</b>	
<b>Endothelzellverbands nach proinflammatorischer Stimulation</b> .....	47
4.4.1. Qualitative Detektion dynamischer Prozesse	
innerhalb der Endothelzellmembran .....	47
4.4.2. Quantitative Detektion endothelialer Ceramid- und	
SMPD1-Intensitäten nach proinflammatorischer Stimulation .....	53
<b>4.5. Inhibition endothelialer sSMPD1-Sekretion</b> .....	59
4.5.1. Modulierende Effekte der endothelialen	
sSMPD1-Proteinsekretion durch Rottlerin .....	59

4.5.2. Inhibitorische Effekte von Brefeldin A auf endotheliale sSMPD1-Sekretion .....	63
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>65</b>
5.1. Die sSMPD1 bei systemischen Inflammationszuständen .....	65
5.2. Die sSMPD1 im Kontext zu klinischen Entzündungsparametern.....	68
5.3. Endothelzellen als inflammatorisch kompetente Strukturen .....	70
Methodenkritik: Metabolisches Labelling von HMEC-1 .....	70
Methodenkritik: Konfokalmikroskopische Analyseverfahren .....	72
5.4. Endothelialer Sphingomyelinmetabolismus: Dynamisches Verhalten von sSMPD1 und den Produkten im Inflammationsprozess.....	73
5.5. <i>Rafts</i> : Endotheliale Membrandynamik nach proinflammatorischer Stimulation .....	76
5.6. Endothelialer Sphingomyelinmetabolismus unter Einfluss verschiedener Inhibitoren .....	79
5.7. Differenzierung der sSMPD1-Wirkung mittels unspezifischer Inhibitoren .....	82
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>85</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BFA	-	Brefeldin A
BSA	-	bovines Serumalbumin
CD	-	<i>cluster of differentiation</i>
Cer	-	Ceramid
Cy5	-	Cyanin 5
DC	-	Dünnschichtchromatographie
Fas	-	<i>fibroblast-associated-receptor</i> (Synonyme: CD95, Apo1)
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat
IC <sub>50</sub>	-	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ICU	-	<i>intensive care unit</i>
FCS	-	<i>fetale calf serum</i>
GlcCer	-	Glykosylcerebrosid (Synonym: <i>glucosylceramide</i> )
HBSS	-	<i>Hank`s Balanced Salt Solution</i>
HMEC-1	-	<i>humane microvascular endothelial cells</i>
k <sub>m</sub>	-	Michaeliskonstante
LAU	-	<i>light absorption units</i>
LSM	-	Laser-Scanning-Mikroskop
MAS	-	Makrophagenaktivierungssyndrom
MODS	-	<i>multiple organ dysfunction syndrome</i>
NB6	-	(3-Carbazol-9-yl-propyl)- (2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-ethyl)-methylamin
NBD	-	N-((7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino)hexanoyl)
PKC-δ	-	Proteinkinase C-δ
rf	-	Retentionsfaktor
rE	-	relative Einheiten
SIRS	-	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SM	-	Sphingomyelin
SMPD1	-	saure Sphingomyelinase
sSMPD1	-	sezernierte saure Sphingomyelinase
V <sub>max</sub>	-	maximale enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	-	Volumen / Volumen

## Zusammenfassung

### „Systemische Wirkung sezernierter Sphingomyelinase bei Entzündung“

**Einleitung** Entzündungsprozesse können sich durch ein komplexes Netzwerk verschiedener proinflammatorischer Faktoren präsentieren. Innerhalb dieses Spektrums vermitteln einige Metabolite des inerten Zellmembran-Lipids Sphingomyelin Schlüsselfunktionen in der Einleitung der zellulären Stressantwort. Ceramid, dessen zellmodulierende Effekte auf teilweise unterschiedlichen Wirkungsprofilen basieren, stellt dabei einen bedeutenden bioaktiven Hauptmetaboliten dar. Sphingomyelinasen wiederum sind Schlüssel- und Schrittmacherenzyme bei der Umwandlung des membranständigen Sphingomyelins in Ceramid. Unter den fünf bekannten Sphingomyelinase-Isoformen scheint die Sphingomyelin-Phosphodiesterase1 (SMPD1) die einzige Isoform zu sein, die einem entzündungsabhängigen Sekretionsmechanismus unterliegt. In diesem Kontext wird das humane Endothel als besonders SMPD1-sekretionsaktiver Gewebstyp beschrieben und vermittelt aufgrund seiner ubiquitären Lage und Funktion als Grenzschicht und Gewebebarriere bedeutsame pathophysiologische Funktionen im systemischen Entzündungsgeschehen. Endothelzellen bilden das primäre Kontaktorgan gegenüber einer Vielzahl verschiedener, generalisierter Reize und unterliegen im Rahmen einer SIRS oder eines septischen Prozesses einer permanenten Stimulation mit der Gefahr einer folgenschweren globalen Endotheldysfunktion, welche in möglichem Multiorganversagen enden kann. Interessanterweise lässt sich bei akuten und chronischen Inflammationszuständen wie der chronischen Herzinsuffizienz, dem *systemic inflammatory response syndrome* sowie der Sepsis eine signifikant erhöhte systemische Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase (sSMPD1) nachweisen. Welche genauen zellulären Effekte diesem Enzym bei der Initiation der endothelialen Stressantwort zukommen, ist jedoch bisher noch nicht ausreichend geklärt.

**Zielstellung** Als wesentliches Ziel wurde untersucht, ob der entzündungsassoziierte Aktivitätsanstieg der sSMPD1 hinsichtlich einer systemischen Wirkung auf Endothelzellen von Bedeutung ist. Dazu gingen wir zunächst der Frage nach, ob ein erhöhter sSMPD1-Serumspiegel mit einer verstärkten endothelialen Ceramidgenerierung korreliert. In weiteren Schritten erfolgte die Untersuchung quantitativer und qualitativer Effekte des proinflammatorisch veränderten Sphingomyelin-Metabolismus am Endothel sowie die Analyse möglicher struktureller Veränderungen der dem Gefäßlumen zugewandten Endothelzellmembran aufgrund eines SMPD1-induzierten, veränderten Sphingolipidmusters, insbesondere hinsichtlich Ceramidgenerierung sowie dessen Aggregation.

**Material und Methoden** Zunächst erfolgte die Ermittlung der Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase im Serum von Patienten mit schwerer Sepsis im Vergleich zur Serumaktivität gesunder Kontrollprobanden anhand eines fluorimetrischen *in house*-Assays. Darauf basierend führten wir Stimulationsversuche mit Patientenserum und Inhibitorstudien bezüglich der sSPMD1-Reaktionskinetik am *in vitro*-Modell humaner mikrovaskulärer Endothelzellen durch. Methodische Grundlage stellte hierbei ein metabolisches Labelling des Endothels mit fluoreszenzmarkiertem, kommerziell erhältlichem NBD-Sphingomyelin dar. In konfokalmikroskopischen Betrachtungen untersuchten wir schließlich die zu erwartende, dynamische Bildung Ceramid-reicher *rafts* sowie einer noch näher zu analysierenden Enzym-Ceramid-Inhibitor-Interaktion an der Außenseite der Zellmembran nach proinflammatorischer Stimulation des Endothels.

**Ergebnisse und Schlussfolgerungen** Unter proinflammatorischen Bedingungen ist im Endothelzellmodell die sSMPD1 für eine extrazelluläre Hydrolyse des mit bis zu 85mol % in der äußeren Zellmembran abundanten Sphingomyelins primär verantwortlich. Unsere Beobachtungen erweitern dabei die bisherigen Kenntnisse über die beim kritisch kranken Patienten gesteigerte sSMPD1-Serumaktivität, indem erstmals eine konkrete, konzentrationsabhängige Wirkung des Enzyms am intakten, Infektort-fernen Endothelzellverband nachgewiesen werden konnte. Charakteristisch für die aufgrund des Inflamationsprozesses verstärkt im Blutkreislauf wirksame sezernierte Sphingomyelinase ist demnach eine deutlich gesteigerte endotheliale Ceramidgenerierung, welche mit der Enzymaktivität positiv korreliert. Im Zuge unserer konfokalmikroskopischen Betrachtungen gelang es uns, nach proinflammatorischer Stimulation der Endothelzellen mit Patientenserum, eine gehäufte und distinkte Formation möglicherweise signalaktiver Ceramidareale in der Membran zu visualisieren. Darüber hinaus konnte nach Entzündungsreizen eine ausgeprägte Assemblierung des CD95-Todesrezeptors kolokalisiert zu den Ceramid-*rafts* beobachtet werden. Demgegenüber zeigten Kontrollexperimente, bei denen die Zellen mit Serum gesunder Probanden inkubiert wurden, eine deutlich geringere Ceramidgenerierung mit kaum nachweisbarer *raft*-Formierung und nur marginal messbarem CD95-Rezeptor-*clustering* innerhalb der Membrandomänen. In der vorliegenden Arbeit wurden somit Mechanismen aufgezeigt, die zu einem verbesserten Verständnis über die Wirkung der im Blut zirkulierenden sezernierten Sphingomyelinase beitragen. Wir lieferten Hinweise, dass dieses Protein sich nicht nur als Epiphänomen einer systemischen Inflamationsreaktion wie der Sepsis darstellt, sondern auch konkrete, proapoptotische Wirkung an Endothelzellen entfaltet und somit eine maßgebliche Rolle bei der Initiierung einer folgenschweren generalisierten Endotheldysfunktion spielen kann.



# 1. Einleitung

## 1.1. Inflammationsreaktion

Der Begriff Entzündung (lat: *Inflammati*o) lässt sich beschreiben als eine charakteristische Abwehrantwort des biologisch aktiven Gewebes gegen pathogene Reize verschiedenster Ursachen mit dem Ziel der Vermeidung oder Minimierung einer Gewebsschädigung. Verlauf und Ausmaß einer Inflammation werden wesentlich von Qualität und Intensität des Pathogens bestimmt, welches sich in einem mannigfaltigen Spektrum darstellt. Neben physikalischen Faktoren (Temperatur, Strahlung), mechanischen Reizen (Druck, Reibung) oder chemisch toxischen Substanzen bewirkt vor allem die Infektion mit Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten) (Pschyrembel 1998) sowie der Gewebkontakt mit deren mikrobiell-toxischen Produkten (Endotoxine, Exotoxine) die Initialisierung einer Entzündungsreaktion. Jedoch verursachen auch endogene, d.h. vom eigenen Organismus ausgehende Reize inflammatorische Reaktionen auf den Zellverband. Aber auch Produkte nekrotischer Zytolyse, sowie freigesetzte Bestandteile während der Wirkung autoaggressiver Immunzellen lassen sich im engeren Sinne als endogene Entzündungsauslöser bezeichnen. Im weitesten Sinne birgt somit jeder, den intakten Zellverband schädigende Insult inflammatorisches Potential.

Die Prognose einer Entzündung *in vivo* ist neben dem Ausmaß des pathogenen Reizes auch stark von der Wirksamkeit der zellulären und humoralen Immunantwort abhängig.

Alle körpereigenen Regulationen in Bezug auf ein zunächst lokales Entzündungsgeschehen münden in den fünf typischen klassischen Entzündungszeichen nach Celsus (~20 n.Chr.) und Virchow (1858). Hitze (Calor) und Rötung (Rubor) sind begründet in einer durch inflammatorische Mediatoren getriggerten Gefäßrelaxation, welche einen erhöhten Blutfluss im Entzündungsgebiet zur Folge hat. Dies gewährleistet eine suffiziente Versorgung mit immunkompetenten Faktoren bei optimierter lokaler Temperatur. Schwellung (Tumor) entsteht als Konsequenz des erhöhten hydrostatischen Drucks sowie gesteigerter Permeabilität in betroffenen Gefäßen und der daraus konsultierenden Ödembildung im extravaskulären Kompartiment. Schmerz (Dolor) sowie Funktionseinschränkung (Functio Laesia) wirken unter anderem durch Ruhigstellung schützend auf das Inflammationsareal und komplettieren somit die klassischen Entzündungszeichen im Sinne einer optimal abgestimmten komplexen Reaktion des Körpers auf die Gewebsalteration. Durch dieses stereotype Zusammenspiel kann eine höchstmögliche Effizienz aller immunkompetenten Faktoren gesichert werden. Ziel ist es, eine Entzündungsausbreitung bei drohender systemischer Erregerstreuung zu verhindern,

Infektionsschäden einzugrenzen sowie die ursprüngliche Gewebefunktion aufrecht zu erhalten und gegebenenfalls zu restituieren.

## **1.2. Systemische Inflammationsreaktion**

Ist es einem infizierten Organismus nicht möglich, entzündliche Herde mit dem ihm zur Verfügung stehenden Abwehrmaßnahmen zu bekämpfen, droht eine Generalisierung der Entzündungsreaktion. In den meisten Fällen ist diese geprägt durch Gefäßinvasion proliferierender mikrobieller Erreger aus dem infektiösen Fokus in den Blutkreislauf. Vielfältige Stimuli, einschließlich jedweder Mikroorganismus-Klasse sowie deren Endotoxine oder Superantigene können systemisch präsent werden und generalisiert entzündungsauslösend wirken (Schuster und Werdan 2000). In selteneren Fällen kann der Körper auch ohne Ausbildung einer Bakteriämie, welche sich durch Erregerpersistenz und deren Nachweisbarkeit im Blut auszeichnet, eine Inflammationsantwort im Sinne einer generalisierten Immunaktivierung entwickeln. So ist es auch möglich, dass Gewebischämie oder traumatische Prozesse ohne direkte Beteiligung von mikrobiellen Pathogenen generalisierte inflammatorische Prozesse induzieren können. Resultat der systemischen Inflammationsreaktion ist im Allgemeinen in der Primärphase eine massive ubiquitäre Freisetzung immunmodulierender Mediatoren proinflammatorischer Qualität. Hierzu zählen im wesentlichen vermehrt oxidativen Stress initierende Sauerstoffradikale vermittelt durch freigesetzte Proteasen (Elastasen, Cathepsine) von aktivierten neutrophilen Granulozyten (Grimminger et al. 1991), verschiedene Lipidmediatoren wie Thromboxane und Prostaglandine sowie immunstimulierende Zytokine. Hauptvertreter dieser Peptidhormone mit proinflammatorischen Wirkprofil sind Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) sowie Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). Das Wirkungsspektrum dieser entzündungsverstärkenden Mediatoren besteht hauptsächlich in Stimulation von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen verbunden mit weiterer Induktion sekundärer Zytokine. Mittels mediatorgetriggelter Diapedese durch aktiviertes Endothel gelingt es solchen immunkompetenten Zellen dabei infektiöse Gewebsherde unmittelbar zu erreichen. Der Stellenwert von IL-6 lässt sich hauptsächlich durch Auslösen einer gesteigerten Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber beschreiben, welche für eine rasche Immunantwort von essentieller Bedeutung sind (Gabay und Kushner 1999). Getriggert durch autokrine und parakrine Zytokineffekte verbunden mit negativen Rückkopplungsmechanismen sowie einem vermuteten Switch der T-Helferzell-Präsenz von TH<sub>1</sub> auf TH<sub>2</sub> entsteht im weiteren Verlauf einer generalisierten Entzündungsreaktion ein

verändertes systemisches Zytokinmuster zugunsten antiinflammatorischer Mediatoren wie beispielsweise IL-8, IL-10, IL-13, IL-4, dem *Transforming Growth Factor*-beta (TGF- $\beta$ ) sowie löslichen Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Familie und löslichen IL-1 Rezeptoren. Diese als hypoinflammatorische Sekundärphase zu betrachtende Regulation erfüllt bei kontrolliertem Entzündungsgeschehen die Aufgabe der Normalisierung der Körperhomöostase durch Einleitung regenerativer Prozesse.

### 1.3. SIRS und Sepsis

Die Ausbildung eines „*systemic inflammatory response syndrome*“ (SIRS) oder „systemisches Entzündungsreaktionssyndrom“ (Schuster und Werdan 2000) ist erläutert als eine allgemeine entzündliche Abwehrreaktion auf verschiedene Reize und wird klinisch durch Präsenz von mindestens zwei der folgenden Symptome diagnostiziert.

- „ 1. Körpertemperatur  $> 38^{\circ}\text{C}$  oder  $< 36^{\circ}\text{C}$ ,
- 2. Herzfrequenz  $> 90/\text{min}$ ,
- 3. Atemfrequenz  $> 20/\text{min}$  und/oder arterieller  $\text{pCO}_2 < 32\text{mmHg}$   
und/oder maschinelle Beatmung,
- 4. Leukozyten  $> 12000/\text{mm}^3$  oder  $< 4000/\text{mm}^3$  oder  $> 10\%$  unreife (stabförmige) Formen; “  
(Leitlinie der deutschen Sepsisgesellschaft)

Als potentielle Ursachen einer überschießenden Abwehrreaktion im Sinne eines SIRS determinieren sich infektiöse als auch nichtinfektiöse Prozesse wie schwere Traumata, kardiopulmonale operative Eingriffe, Reperfusionsschäden, Pankreatitiden, Intoxikationen oder Vaskulitiden (Levy, Fink et al. 2003). Eine Sepsis wiederum konkretisiert sich bei analogen klinischen Manifestationen durch Vorliegen oder dem dringenden Verdacht einer Infektion oder eines infektiösen Fokus. Charakteristischerweise erfolgt bei beiden Formen eine Entfesselung der physiologischen Abwehrreaktion (*host response*). Die beschriebene primäre Immunantwort auf einen entzündlichen Reiz entwickelt sich oft in einem hyperinflammatorischen und unkontrollierten Ausmaß mit dem Resultat einer meist starken Hyperzytokinämie proinflammatorischer Qualität, rasch gefolgt von einer entgegengesetzten aber vergleichbar massiven immunparalytischen Sekundärphase. Ein solch enormer und kurzfristiger Ausstoß von immunaktivierenden Zytokinen, verbunden mit einer Modulation der Leukozytenfunktion birgt einerseits die Gefahr der Einbindung von gesundem Gewebe in den Entzündungsprozess auf systemischer Ebene. Dabei droht die autogene Aktivierung und Destruktion von intaktem Gewebe mit möglicher erneuter Freisetzung von Immunmediatoren. Andererseits resultiert aus einer raschen und überschießenden *host response* ein potentielles

Defizit an Immunfaktoren, wodurch bei noch persistierender Erregerstreuung im Organismus Sekundärinfektionen mit kommensalen, fakultativ pathogenen Keimen begünstigt werden. Auf pathophysiologischer Ebene zeigt ein von SIRS oder Sepsis betroffenes Kreislaufsystem schwerwiegende und oft vital bedrohliche Folgen. Generalisierte Hypotonie aufgrund globaler Vasodilatation kann einen septischen Schockzustand initiieren, Ischämie und drohende Hypoxie auf Mikrozirkulationsniveau sind zu befürchten. Weitere folgeschwere Zustände entstehen beispielsweise bei „disseminierter intravasaler Koagulopathie“ (DIC) und einem daraus resultierenden Gerinnungsfaktorenmangel (Dhainaut, Yan et al. 2004). Dieser kann bei gleichzeitig vorherrschender Endothelzellaktivierung oder Vaskulitis zu deutlichem Volumenverlust, im Sinne von petechalen ubiquitären Blutungen führen. Da ein insuffizientes Sauerstoffangebot des Blutes auf mehreren Ursachen basieren kann (Abfall von Herzzeitvolumen und/oder Hämoglobinkonzentration), wird offensichtlich, dass beim septisch entgleiten Organismus als Kardinalproblem die multiorganisch lokalisierte Gewebshypoxie anzusehen ist (Bauer 2003). Massive Ödembildung im extravasalen Kompartiment bei herabgesetztem onkotischen Druck aufgrund hämatogenen Proteindefizits, Elektrolytverschiebungen sowie Laktatazidose erweitern die Problematik des kritisch kranken Patienten und determinieren zusätzlich das Vollbild einer schweren Sepsis (Kortgen, Niederprum et al. 2006). Die Gefahr eines lebensbedrohlichen „*multiple organ dysfunction syndrome*“ (MODS) stellt durch weitreichende Parenchymdestruktion die gemeinsame Endstrecke des folgeschweren Krankheitsbildes des SIRS oder Sepsis dar (Bauer, Brunkhorst et al. 2006). Nach heutigem Verständnis der pathophysiologischen Abläufe einer systemischen Inflammationsreaktion sind somit Ausmaß und Krankheitswert einer Sepsis stärker geprägt durch die fehlgeleitete, überschießende Reaktion des Patienten auf den entzündlichen Reiz als die Pathogenität oder Virulenz des Reizes selbst (Schuster und Werdan 2000).

#### **1.4. Das Makrophagenaktivierungssyndrom als Beispiel systemischer Inflammation**

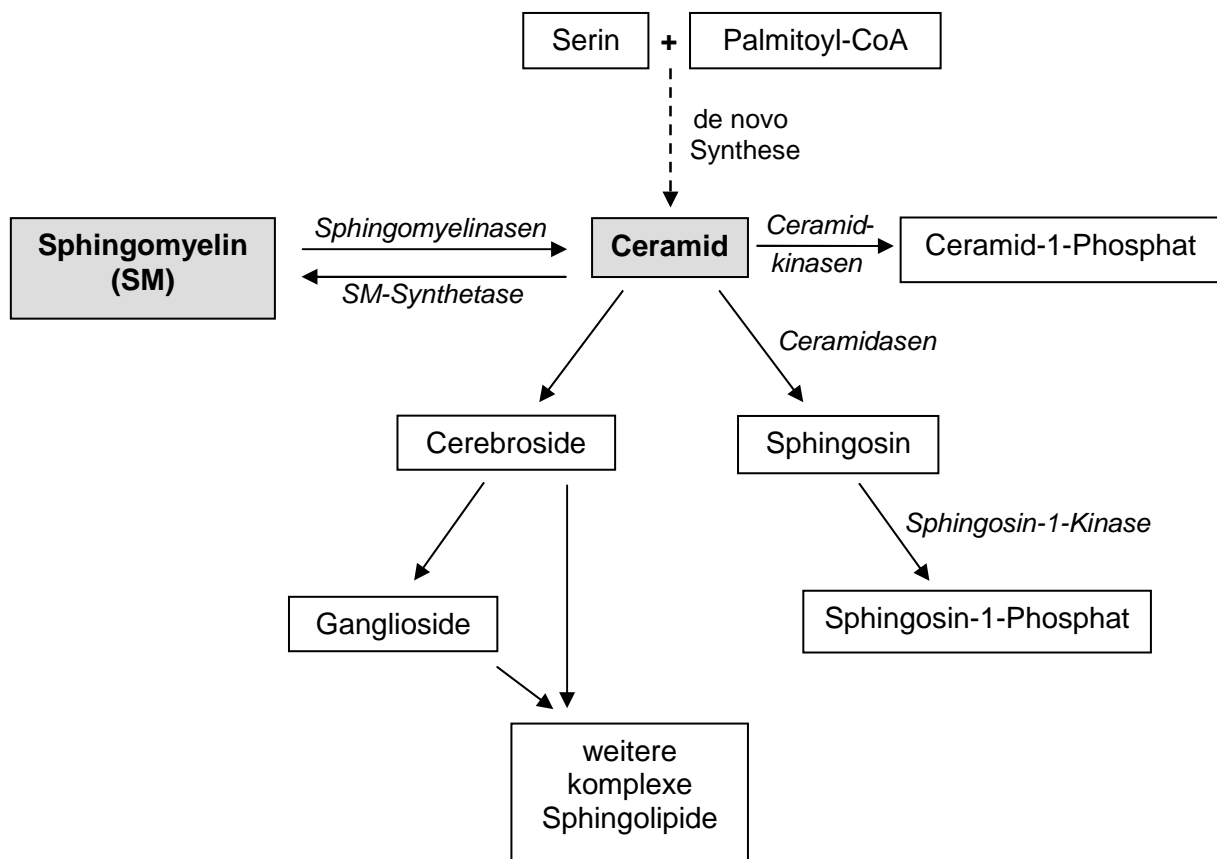
Unter den facettenreichen Erscheinungsformen des generalisierten Entzündungsprozesses lässt sich das Makrophagenaktivierungssyndrom (MAS) als ein drastisches, vorwiegend Kleinkinder betreffendes Krankheitsbild charakterisieren, welches sich pathophysiologisch unter anderem durch hohe proinflammatorische Zytokinfreisetzung definiert. In seiner primären, familiären Form als auch in der sekundären, erworbenen Form wird das MAS gehäuft bei juvenilen virusassoziierten Infektionen beobachtet, bei denen die zelluläre Immunabwehr, präsentiert durch CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten und NK-Zellen, in Bezug auf Perforin-

vermittelte Zytotoxizität insuffizient zu sein scheint (Grom 2003), (Ravelli 2002). Resultat der unzureichenden Infektionsabwehr ist eine kompensatorische Hochregulation der zellulären, insuffizienten Abwehr, gekoppelt mit massiver Zytokinämie. Hierbei wird vornehmlich Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) für eine teilweise exzessive und protrahierte Aktivierung von Makrophagen verantwortlich. Diese wiederum können in ihrer entfesselten Tätigkeit gravierende autodestruktive Ausmaße annehmen, wodurch in Zusammenhang mit der meist persistierenden Infektion ein vital bedrohliches MODS eintreten kann (Janka 2007). Die Zuordnung zum Formenkreis der Hämophagozytosesyndrome (HLH) bezieht sich auf histopathologisch imponierende, von Makrophagen phagozytierte Blutbestandteile wie Erythrozyten, Leukozyten oder Thrombozyten. Neben Hypofibrinogenämie und Hypertriglyceridämie ist das MAS durch autoaggressive Zelllyse diagnostisch vor allem durch deutliche Ferritinerhöhung ( $>>1000\text{ng/ml}$ ; *sic*) sowie Erhöhung von Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum gekennzeichnet (Cortis und Insalaco 2006). Klinisch werden die Patienten oft durch Fieber, Splenomegalie und Panzytopenie determiniert (Shi, Wang et al. 2006). Anhand des Beispiels des Makrophagenaktivierungssyndroms wird erkennbar, mit welcher ausgesprochenen Vielfältigkeit und Bedrohlichkeit sich Entzündungsprozesse im lokalen und systemischen Rahmen dem Wirt präsentieren. Somit ist es von großer Bedeutung, geeignete diagnostische Verfahren und klinische Interventionsmethoden zu entwickeln, die einerseits eine exakte Determination der Krankheitscharakteristik erlauben sowie andererseits speziell angepasste, suffiziente Behandlungen garantieren. Hierbei stellt die Grundlagenforschung biochemischer Prozesse auf zellulärer Ebene eine wichtige Basis dar, die ein besseres Verständnis komplexer pathophysiologischer Mechanismen ermöglicht und somit die Entrichtung weiterführender Behandlungsansätze erlaubt.

### **1.5. Die Biochemie der Sphingolipide als bedeutende Membranlipide**

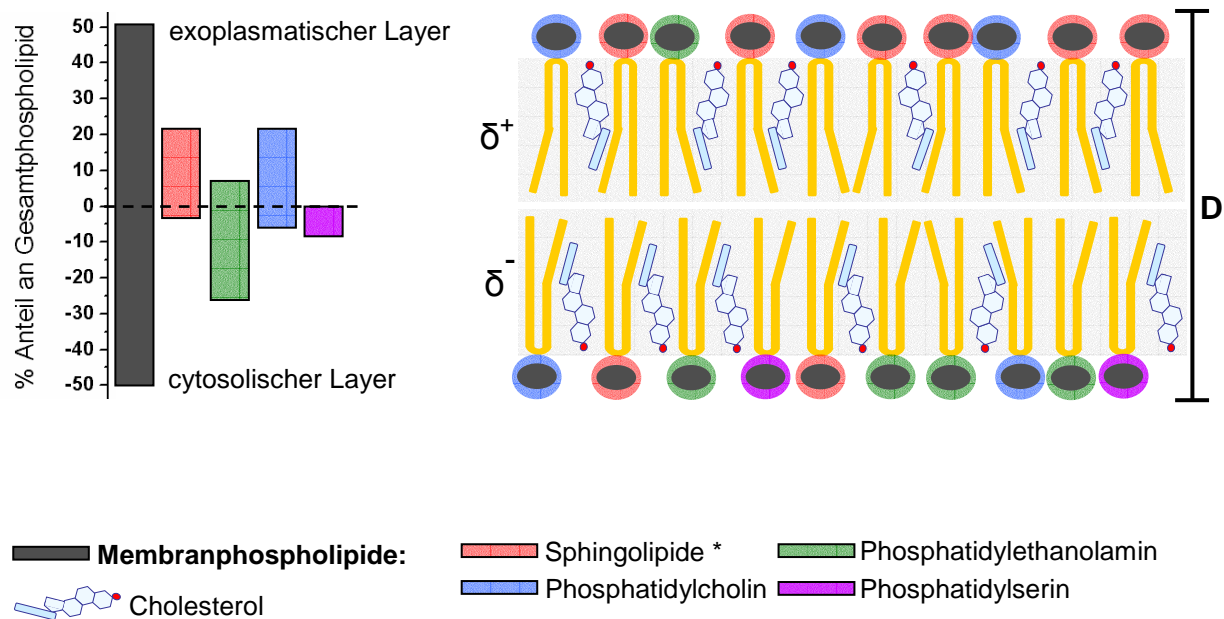
Die eukaryotische Zellmembran sowie Membransysteme eukaryotischer Zellorganellen stellen sich als 6-9nm dicke Doppellipidschicht dar. Zu den integralen Membranbausteinen dieses hochkomplexen zweidimensionalen Phospholipidfilms zählen Glycerophospholipide, Sterole, Sphingolipide sowie Membranproteine verschiedenster Funktionen, welche in diesem Membrankonstrukt mehr oder weniger frei beweglich vorherrschen (Singer und Nicolson 1972). Der Grundaufbau der Sphingolipide ist charakterisiert durch Prävalenz des zweiwertigen Aminoalkohols Sphingosin, im Gegensatz zu Phospholipiden, welche sich vom dreiwertigen Alkohol Glycerol ableiten. In Abhängigkeit des am Sphingosingerüst

gebundenen Restes lassen sich drei Untergruppen der Sphingolipide definieren. Stellt der Rest lediglich ein Wasserstoffatom dar, so entsteht durch Bildung einer primären Hydroxylgruppe mit Ceramid das einfachste Sphingolipid. Durch Initialisierung einer Glykosidbindung mit verschiedenartigen Zuckerresten an das Ceramid entstehen vielfältige Glykosphingolipide, zu denen auch Cerebroside und Ganglioside zählen (Tani, Ito et al. 2007), (Leipelt, Warnecke et al. 2001). Wird Ceramid mit Phosphorylcholin verestert, so ergibt sich die dritte große Sphingolipid-Untergruppe, die Sphingomyeline.



**Abb. 1: Komplexität des Sphingolipidmetabolismus** Vereinfachte Darstellung ausgewählter, wichtiger Sphingolipide und deren Derivate. Enzymbezeichnungen sind in kursiver Schriftart angegeben.

Um physiologische Aufgaben wie Infektabwehr, Zelladhäsion, Exozytose/Endozytose sowie unterschiedlichste Arten von Transportprozessen oder Signaltransduktion zu erfüllen, ist es für die Zelle sinnvoll, ein System mit asymmetrischem Verteilungsmuster der einzelnen Bestandteile innerhalb der Zellmembran aufrecht zu erhalten (Gordesky und Marinetti 1973). Somit ist beispielsweise die Lokalisation von dem mit positiven Kopfgruppen versehenen Sphingomyelin mit bis zu 10fach erhöhter Konzentration vornehmlich im exoplasmatischen Membranfilm zu beobachten (Cremesti, Goni et al. 2002). Je nach Aufgabe und Lokalisation im Gewebsverbund sind Körperzellen durch spezifische Zellmembran-Beschaffenheiten optimal an die physiologischen Anforderungen adaptiert. Die unter anderem bei intestinalen Epithelzellen beobachtete Distribution von Sphingolipiden (38mol % in der apikalen Zellmembran; 19mol % in der basolateralen Zellmembran) (van Meer und Lisman 2002) impliziert, dass neben der den Sphingolipiden lange Zeit zugesprochenen Rolle der Aufrechterhaltung der Membranstabilität und Schutzfunktion auch weitaus komplexere Aufgaben zugrunde liegen. Seit einigen Jahren werden vermehrt Stoffwechselkaskaden beobachtet, in denen unterschiedliche Sphingolipidspezies involviert sind. Eine zentrale Rolle nimmt dabei der aus Sphingomyelin generierbare bioaktive Lipidmediator Ceramid ein, welcher in Folgereaktionen in weitere Mediatoren mit teilweise gegensätzlicher Wirkung auf Zellaktivierungsstatus, Zellzyklus und Differenzierungsgrad umgewandelt wird und somit wichtige Funktionen als *second messenger* in der Pathophysiologie der Zelle repräsentiert (Gulbins und Li 2006). Die Ceramidgenerierung lässt sich einerseits auf die *de novo*-Synthese aus Serin und Palmitoyl-CoA zurückführen, ein wesentlich schnellerer und kurzfristig ergiebigerer Produktionsweg ist jedoch die Sphingomyelinhydrolyse durch Sphingomyelinasen als Schrittmacherenzyme dieser Stoffwechselkaskade. Obwohl viele Pfade des Sphingolipidstoffwechsels Grundlage reger wissenschaftlicher Untersuchung darstellen und vielversprechend entschlüsselt sind, bleibt bisher ein Großteil der hochkomplexen Zusammenhänge unbeantwortet.



**Abb. 2: Asymmetrisches Phospholipidverteilungsmuster der Zellmembran.** Auf beiden Membranseiten steht die Menge an Gesamtpospholipiden im Gleichgewicht. Die Zellmembranaußenseite wird überwiegend von Phosphatidylcholin und Sphingolipiden gebildet. Aufgrund zahlreicher Glykosylierungen, die in ihrer Gesamtheit als Glykokalix beschrieben werden, entsteht hier eine positive Partialladung ( $\delta^+$ ). An der zytosolischen Seite der Doppellipidschicht, welche eine negative Partialladung aufweist ( $\delta^-$ ), dominieren Phosphatidylethanolamin sowie Phosphatidylserin. Die Dicke (D) des Bilayers variiert je nach Zusammensetzung und Reaktionszustand zwischen 3,5nm und 5,6nm. Der integrative Aufbau von Membrankonstrukten unterliegt ständigen dynamischen Schwankungen, die eine Grundlage für flexibles und anpassungsfähiges Membranverhalten darstellen.

\* Das Sphingolipidmuster wird in der Membran zum überwiegenden Teil durch Sphingomyelin geprägt und ist ebenfalls durch dynamische Fluktuationen in seiner Zusammensetzung geprägt. Einen weitaus kleineren Anteil der komplexen Gruppe der membranständigen Sphingolipide bilden einfachere Strukturen wie Sphingosine sowie die direkten Sphingomyelinhydrolyseprodukte, die bioaktiven Ceramide. Aber auch zahlreiche Ceramiderivate wie Cerebroside oder Ganglioside sind in Membransystemen auffindbar. (Modifizierte Grafik nach Nordheim, A 2006)

## 1.6. Sphingomyelinasen

Sphingomyelinasen sind Phospholipase-C-ähnliche Enzyme, die membranständiges Sphingomyelin in Ceramid und Phosphorylcholin hydrolytisch spalten. Die derzeit bekannten Enzym-Isoformen in Eukaryonten lassen sich in fünf Klassen unterteilen (Samet und Barenholz 1999), welche sich maßgeblich in Regulationsmechanismen, Wirkungsort, pH-Optimum und Einbindung in Zellregulationsprozesse differenzieren (Liu, Obeid et al. 1997). Die neutrale Sphingomyelinase lässt sich in zwei Isoformen gliedern, wobei die  $Mg^{2+}$ -abhängige Form, charakterisiert als integrales Membranprotein, vorwiegend in Gehirn- und Brustdrüsengewebe vorkommt. Diesem Enzym, welches auf ein pH-Optimum von 7,4 zur bestmöglichen katalytischen Aktivität sowie auf  $Mg^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen im millimolaren Bereich angewiesen ist (Goni und Alonso 2002), wird ebenfalls eine



hypothetische Funktion bei proinflammatorischen Zellregulationen sowie im entzündlichen Atheroskleroseprozeß zugeschrieben. Dies suggerieren Beobachtungen, wonach die neutrale,  $Mg^{2+}$ -abhängige Sphingomyelinase nach Zytokinstimulation durch  $TNF-\alpha$  und oxidierten *low density lipoproteins* (LDL) Sphingomyelin verstärkt hydrolytisch umsetzt und abundant den bioaktiven Lipidmediator Ceramid generiert (Chatterjee 1999), (Loidl, Claus et al. 2004). Die ebenfalls bei pH 7,5 optimal arbeitende  $Mg^{2+}$ -unabhängige Form der neutralen Sphingomyelinase ist in zytosolischen Zellkompartimenten lokalisiert. Dieser relativ unerforschten Sphingomyelinase-Isoform werden Funktionen im Zelldifferenzierungsprozeß zugesprochen (Okazaki, Bielawska et al. 1994). Die ausschließlich im Intestinaltrakt beobachtete, alkalische Sphingomyelinase spielt eine physiologische Rolle bei der Verdauung von nutritivem Sphingomyelin und ist optimal katalytisch wirksam bei pH 9,0. Ihre Aktivität ist nicht abhängig von Metallionen, jedoch ist die Präsenz von Galleflüssigkeit von essentieller Bedeutung für eine suffiziente Umsatzrate (Goni und Alonso 2002). Als Hinweis der weitreichenden Komplexität des Sphingolipidstoffwechsels, verbunden mit der erheblichen Bedeutung der regulierenden Sphingomyelinasen, erscheint dabei die signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit auf Entstehung eines Kolonkarzinoms, welches bei Enzymdefekt oder Enzymmangel der alkalischen Sphingomyelinase entdeckt wurde (Cheng, Nilsson et al. 2002). Der Formenkreis der eukaryontischen Sphingomyelinasen wird durch die beiden Formen der sauren Sphingomyelinase komplettiert.

### **1.7. Die lysosomale und sezernierte Isoform der sauren Sphingomyelinase**

Die bei pH 5,0 optimal katalysierenden Isoformen der sauren Sphingomyelinasen lassen sich bezüglich Wirkungsort in die lysosomale saure Sphingomyelinase (SMPD1) sowie in eine in den Extrazellularraum sezernierte Form unterteilen (sSMPD1). Obwohl beide Enzyme einem identischen Genlocus (Chromosom 11p15.1–11p15.4) mit übereinstimmendem Transkript entspringen und sich im Prozeß der posttranslationalen Modifikation von einem einheitlichen Precursorprotein ableiten (da Veiga Pereira, Desnick et al. 1991), erfolgt ein unterschiedlicher zellulärer Proteintransport zu den Zielkompartimenten. Die lysosomale Isoform erreicht ihren deklarierten Wirkungsort über Mannose 6-Phosphat-Shuttle-Konstrukte (M6P-Rc) (Hurwitz, Ferlinz et al. 1994), sowie alternativ über ein Sortilin-Rezeptor-System, welches ein erst kürzlich entdecktes transmembranöses Glykoprotein vom Typ1 darstellt (Ni und Morales 2006). Demgegenüber erfolgt der Transport des Precursorproteins der im weiteren Verlauf sezernierten Sphingomyelinase zum Golgi-Apparat und unterliegt dort vor der Sekretion

komplexen Glykosylierungsprozessen und N-terminalen Umstrukturierungen (Ferlinz, Hurwitz et al. 1997). Anschließend wird die sSMPD1 interessanterweise über non-lysosomale Transportwege, also ohne vorherigen Kontakt zum Lysosom aus der Zelle geschleust (Schissel, Keesler et al. 1998). Da die sezernierte Sphingomyelinase-Isoform bei ihrer Aktivität im Extrazellularraum partiell auf  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen angewiesen ist und diese Zinkabhängigkeit bei Beobachtungen der sauren Sphingomyelinase im Lysosom nicht festgestellt wurde, glaubte man einige Zeit, hierdurch eine wichtige Eigenschaft zur Unterscheidung beider Isoformen gefunden zu haben. Die Vermutung, dass beide Isoformen Zinkmetalloenzyme sein könnten, konstatierten Schissel et al. 1998 nach Beobachtungen, wonach die saure Sphingomyelinase während des Transports zum Lysosom mit zellulären  $\text{Zn}^{2+}$ -pools interagiert und somit eine partielle Enzymaktivierung erfährt (Schissel, Keesler et al. 1998). Dementsprechend ist die lysosomale Kolokalisation von  $\text{Zn}^{2+}$  nicht zwingend erforderlich für die hydrolytische SMPD1-Aktivität. Die Erkenntnis, dass beide Enzym-Isoformen über mehrere Aminosäuresequenzen verfügen, die Homologie zu zinkbindenden Domänen von Metalloproteinasen aufweisen, festigte weiterhin die Vermutung der relativen Abhängigkeit von diesem Ion (Vallee und Auld 1990), (Schissel, Keesler et al. 1998). Mutationen und Defekte zinkbindender Regionen könnten unter anderem Grundlage und Ursache einer starken Aktivitätseinschränkung oder eines Aktivitätsverlustes der sauren Sphingomyelinase darstellen (Schissel, Schuchman et al. 1996). Die daraus korrespondierende Störung des physiologischen Sphingolipidabbaus verbunden mit zellulärer Akkumulation und progredienter Ablagerung, gekoppelt mit wachsender zellulärer Dysfunktion sowie letztendlich Zelluntergang beschreibt die Pathophysiologie des schweren Krankheitsbildes der Sphingomyelinspeicherkrankheiten oder Sphingomyelinlipidosen (*National Niemann-Pick Disease Foundation Inc.*). Das Niemann-Pick Syndrom präsentiert hierbei den prominentesten Vertreter. Diese autosomal-rezessiv vererbte Form der Sphingomyelinlipidose, für die zahlreiche Mutationen der SMPD1 beobachtet wurden, kennzeichnet sich abhängig vom Ausmaß der Aktivitätseinschränkung des Enzyms in verschiedenen Schweregraden (Kolodny 2000). Ein besonders massives Defizit der sauren Sphingomyelinase (ca. 99%), geprägt durch schwere neurodegenerative Syndrome, Hepatosplenomegalie und Muskelhypotonie verbunden mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung < 4 Jahren, spiegelt sich beispielsweise in der akut infantilen Form (Typ A) der Niemann-Pickschen-Krankheit wider (Simonaro, Park et al. 2006). Weiterhin werden vielfältige mildere Formen dieses Krankheitsbildes beobachtet, deren klinische Ausprägungen mit einer partiell eingeschränkten Enzymaktivität korrelieren.

Erscheinungsbild und Schweregrad der Sphingomyelinlipidosen als pathologisches Korrelat einer dysfunktionellen Sphingomyelin-spaltenden Hydrolase unterstreichen somit die wichtige physiologische Bedeutung, die diesen Enzymen zugrunde liegt (Schuchman 2007).

### **1.8. Stimulation und Inhibition der sauren Sphingomyelinase**

Die saure Sphingomyelinphosphodiesterase kann durch ein breites Spektrum exogener sowie endogener Reize aktiviert und angeregt werden. Auf Seite der körpereigenen Faktoren sind es vornehmlich proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  sowie der Fas-Ligand (CD95L) und *heat shock proteins*, aber auch zellulären Stress vermittelnde „reaktive oxidative Spezies“ (ROS), welche eine Stimulation der SMPD1 triggern (Schutze, Potthoff et al. 1992), (Cifone, Roncaioli et al. 1995), (Won und Singh 2006). Zusätzlich zu diesen Faktoren können auch verschiedene Lipide, wie Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylinositol (PI) sowie Lipoproteine wie das Apolipoprotein C-III (ApoC-III) als Enzymaktivatoren der SMPD1 dienen (Ahmad, Beaudet et al. 1986), (Kolesnick 1987). Weiterhin besitzen *sphingolipid activator proteins* (SAPs) die Eigenschaft, den durch die saure Sphingomyelinase vermittelten Katabolismus von Sphingomyelin zu beschleunigen (Klein, Henseler et al. 1994), (Wilkening, Linke et al. 1998) indem sie einen signifikant stimulatorischen Effekt auf dieses Enzym erzielen. Interessanterweise ist jedoch die Präsenz von SAPs nicht von essentieller Bedeutung für die Funktion der sauren Sphingomyelinase (Linke, Wilkening et al. 2001). Grund dafür scheint das Vorliegen einer SAP-ähnlichen Subdomäne in der N-terminalen Region der SMPD1 mit autokatalytischer Aktivität zu sein (Lansmann, Schuette et al. 2003).

Neben proinflammatorischen Stimuli lässt sich aber auch ein Defizit an physiologischen Faktoren, wie dem Mangel an *epidermal growth factor* (EGF), der im Rahmen einer ausgeprägten systemischen Inflamationsreaktion auftreten kann, für eine Induktion des Enzyms konstatieren. Auf Seite der exogenen Faktoren zählen neben vielfältigen infektionsassoziierten Pathogenen und deren Toxinen wie dem Lipopolysaccharid (LPS) auch physikalische Faktoren, wie kurzweilige und ionisierende Strahlung zu den Aktivatoren der sauren Sphingomyelinase (Billis, Fuks et al. 1998). Die Zytostatika Rituximab und Daunorubicin werden als Vertreter medikamentöser Stimulantien der sauren Sphingomyelinase beschrieben. Als spezifische physiologische Inhibitoren der SMPD1 gelten Adenosin-3',5'-bisphosphat und Sphingomyelin-verwandte Stoffe wie Phosphatidylinositol-Phosphate, welche teilweise auch nicht-kompetitive Wirkung entfalten können (Kolzer, Werth

et al. 2004). Aber auch der Calciumkanalantagonist Verapamil und strukturähnliche Verbindungen wie SR33557 zeigen spezifische Hemmwirkung auf die saure Sphingomyelinase (Jaffrezou, Herbert et al. 1991). Als effektive und selektive SMPD1-Hemmstoffe werden die trizyklischen Antidepressiva Imipramin und Desipramin beschrieben, deren inhibitorische Wirkung vermutlich auf einer Behinderung der Zellmembran-Enzym-Interaktion beruht, womit ein Kontakt zwischen sSMPD1 und seinem Substrat Sphingomyelin nicht in ausreichender Weise verwirklicht werden kann (Hurwitz, Ferlinz et al. 1994). Durch die räumliche Entfernung könnte zusätzlich auch ein proteolytischer Abbau der sauren Sphingomyelinase im Extrazellularraum gefördert werden (Hurwitz, Ferlinz et al. 1994). Das synthetische Carbazol-Derivat NB6 konnte durch seine inhibitorische Wirkung auf die Sepsis-assoziierte, verstärkte Aktivität der sauren Sphingomyelinase im Blut eine Reduktion des Ceramidumsatzes, verbunden mit erniedrigter Leberzellapoptoserate, erzielen und kann somit als ein spezifischer Inhibitor der sezernierten Isoform der sauren Sphingomyelinase angesehen werden (Llacuna, Mari et al. 2006), (Claus, Bunck et al. 2005).

### **1.9. Das Endothel als zentrales Organ inflammatorischer Prozesse**

Das humane Endothel umfasst als innerste, lumenständige Gefäßschicht des adulten Organismus eine Oberfläche von ca. 1000m<sup>2</sup> und spielt im Entzündungsgeschehen eine maßgebliche Rolle, da es aufgrund seiner ubiquitären Lage und Funktion als Grenzschicht und Gewebebarriere in den meisten Fällen in inflammatorische Prozesse eingebunden ist (Hippenstiel und Suttrop 2003). Bei systemisch generalisierter Entzündungsreaktion bildet das Endothel somit das primäre Kontaktorgan gegenüber einer Vielzahl verschiedener Reize, wie mikrobieller Keime und deren Toxine, freigesetzten endogenen Zytokinen oder akkumulierten, schädlichen Stoffwechselprodukten des Organismus. Durch entzündliche Stimuli aktivierte Endothelzellen zeichnen sich durch einen massiv veränderten Phänotyp aus, welcher mit dem Verlust der antikoagulatorischen Funktion, Initiierung der Komplementkaskade oder der verstärkten Rekrutierung immunkompetenter Zellen mittels erhöhter Präsentation von Adhäsionsrezeptoren wie dem *intracellular adhesion molecule* (ICAM) und dem *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) einhergehen kann.

Zusätzlich stellt die stimulierte Endothelzelle im Blutkreislauf neben einer Vielzahl von anderen Zelltypen eine besonders ergiebige Quelle der sezernierten Form der sauren Sphingomyelinase (sSMPD1) dar, welche hauptsächlich apikal lumengerichtet freigesetzt wird (Marathe, Schissel et al. 1998). Es besteht die Hypothese, dass vom Endothel

ausgeschüttete sSMPD1 im Vergleich zu sSMPD1 anderer Zelltypen wie Makrophagen nur partiell oder gar nicht auf  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen zur Aktivierung angewiesen ist, da beim endothelialen Sekretionsmechanismus wahrscheinlich eine Aufsättigung des Enzyms durch Interaktion mit zellulären  $\text{Zn}^{2+}$ -pools erfolgt (Schissel, Keesler et al. 1998).

Die Zellmembran-assoziierte Generierung des bioaktiven *second messengers* Ceramid aus dem überwiegend im extrazellulärem Lipidlayer vorhandenem Sphingomyelin, lässt sich durch die autokrine und parakrine Aktivität der sSMPD1 am Endothel beschreiben (Tabas 1999). Vom lokalen Geschehen distanziert, scheint die im Blutplasma zirkulierende sSMPD1 ihre proapoptotische Wirkung auch zusätzlich auf systemischer Ebene entfalten zu können. Indiz dafür ist der beobachtete proportionale Zusammenhang von gesteigerter sSMPD1-Aktivität im Serum kritisch kranker Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (Claus, Bunck et al. 2005). Durch verschiedene proinflammatorische Stimuli wie  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  oder PAF getriggert (Goggel, Winoto-Morbach et al. 2004), lässt sich dieser Sphingomyelinase-Isoform somit eine Schlüsselrolle in der akuten Zytokin-induzierten endothelialen Zelldysfunktion zusprechen. Neben der Problematik im akuten Inflamationsprozeß ist die sSMPD1 auch bei der Pathogenese von chronischen Krankheitsprozessen eingebunden, die durch das Endothelgewebe vermittelt werden. Da Sphingomyelin mit einem Anteil bis zu 20% einen nennenswerten Bestandteil des plasmatischen Lipoprotein-Pools darstellt (Nilsson und Duan 2006), kann die saure sezernierte Sphingomyelinase durch die hydrolytische Aktivität wesentlich zur Entstehung ceramidreicher Lipoproteine beitragen, welche verstärkt in subendothelialen atherosklerotischen Plaques akkumuliert werden (Wong, Xie et al. 2000).

In einem wertenden Überblick lässt sich konstatieren, dass im Rahmen eines SIRS oder eines septischen Prozesses eine permanente Stimulation des Endothels erfolgt, welche sich vordergründig durch den charakteristischen massiven *burst* proinflammatorischer Zytokine definiert. Dem infektiösen, pathogenen Reiz selbst wird dabei eher sekundäre Bedeutung zugerechnet. Die Konsequenz einer entgleisten Inflamationsantwort spiegelt sich dann gewöhnlicherweise in einer großflächigen Endotheldysfunktion wider, welche einen zentralen Ausgangspunkt vielfältiger pathophysiologischer Pfade darstellt, die das Krankheitsbild der Sepsis zu einem vital bedrohlichen Vollbild komplettieren.

### **1.10. Biochemische Membranveränderungen: Dynamik Ceramid-reicher *rafts***

Damit ein außenstehendes Signal auf eine Zelle adäquate Wirkung erzielen kann, ist es einerseits möglich Stärke als auch Dauer des Signals zu erhöhen, andererseits können auf der Zelle als Zielorgan dynamische biochemische Veränderungen initiiert werden, durch die ein an sich schwaches und daher inadäquates Signal amplifiziert und in seiner biologischen Effektivität erhöht wird. Solche Prozesse lassen sich beispielsweise auf Membrankonstrukten beobachten, bei denen vor allem Sphingolipide und Cholesterol durch ihre lipophilen biophysikalischen Eigenschaften in der Lage sind, sich gemäß dem „Fluid-Mosaik-Modell“ von anderen Phospholipiden zu trennen, lateral zu diffundieren und sich aufgrund unspezifischer Van-der-Waals-Kräfte zu Membrandomänen, sogenannten „*rafts*“, zu konzentrieren (Gulbins, Dreschers et al. 2004). Diese *rafts* können weiterhin als Plattform einer Assemblierung vielfältiger bioaktiver Zytokinrezeptoren und Proteinkonstrukte dienen und somit hochpotente Signaldomänen bilden (Bollinger, Teichgraber et al. 2005). So führten experimentelle proinflammatorische Zellstimulationen mit verschiedenen Zytokinen, wie beispielsweise dem Fas-Liganden (CD95-Ligand) oder TNF- $\alpha$  zu einem abundanten *clustering* ihrer korrespondierenden, extrazellulär präsentierten Rezeptoren in membranständigen Mikrodomänen, die zu größeren Arealen auf der äusseren Zellgrenzschicht fusionieren (Grassme, Cremesti et al. 2003). Da viele Apoptosesignale erst durch membranassoziierte *raft*-Bildung ihre zelluläre Zielwirkung effektiv entfalten können und die beschriebenen membranständigen *rafts* zum überwiegenden Anteil aus ceramidreichen Domänen bestehen, scheint die hydrolytische Aktivität der sSMPD1 eine zentrale Rolle für die Entwicklung solcher hochpotenter Plattformen einzunehmen und somit bei der damit verbundenen Induktion proapoptotischer Signalkaskaden von großer Bedeutung zu sein (Gulbins und Kolesnick 2002). Diese Hypothese wird zusätzlich verstärkt durch die räumliche Colokalisation der sSMPD1 zu den Ceramid- und Zytokinrezeptor-reichen Membrandomänen, wie sie nach entzündlicher Zellstimulation beobachtbar ist (Grassme, Riehle et al. 2005). Somit könnte die im kritisch kranken Sepsispatienten deutlich erhöhte sSMPD1-Aktivität, in Kombination mit entzündungstypischer Hyperzytokinämie, einen grundlegenden Ausgangspunkt für endotheliale Konformitätsänderungen auf Zellmembranebene darstellen (Claus, Bunck et al. 2005). Die dadurch ausgelöste Aggregation proinflammatorischer Rezeptoren in membranständigen *rafts*, verbunden mit der Einleitung zellulärer Apoptosekaskaden, spiegelt somit möglicherweise einen wichtigen Pathomechanismus lokaler Endotheldysfunktion wider (Zhang, Yi et al. 2006).

## 2. Zielsetzung und Hypothese

Eine prominente Rolle bioaktiver Sphingolipide bei entzündlichen Zellregulationsmechanismen konnte in verschiedenen *in vitro* Studien, in Tiermodellen und bei Untersuchungen am Menschen festgestellt werden und ist daher in den letzten Jahren verstärkt in das Zentrum klinischen Interesses getreten. Die Assoziation einer erhöhten sSMPD1-Aktivität mit akuten und chronischen Inflammationszuständen lässt für die sezernierte Sphingomyelinase somit eine proinflammatorische Rolle bei der Initiierung der zellulären Stressantwort vermuten. Weiterhin ließ sich nach proinflammatorischer Zytokinstimulation die direkte Wirkung der sauren Sphingomyelinase für eine gesteigerte Bildung des Sphingomyelinmetaboliten Ceramid sowie einer damit einhergehenden Initiation apoptosefördernder, Zellmembran-assoziiierter Raftbildung *in vitro* nachweisen.

Als wesentliches Ziel unseres Vorhabens soll daher untersucht werden, ob der entzündungsbedingte Aktivitätsanstieg der sSMPD1 im Blutserum hinsichtlich einer systemischen Wirkung auf Endothelzellen von Bedeutung ist.

### Hierzu entwickeln wir folgende Hypothese:

Die im Verlauf einer Entzündung freigesetzte sSMPD1 entfaltet an der dem Gefäßlumen zugewandten Endothelzelloberfläche systemische Wirkung, welche sich durch niedermolekulare Inhibitoren hemmen lässt.

Zur Bestätigung der Arbeitshypothese wurden folgende Fragestellungen erörtert:

- (1) Korreliert ein erhöhter sSMPD1-Serumspiegel mit einer verstärkten endothelialen Ceramidgenerierung?
- (2) In welchem Ausmaß lässt sich bei akuter systemischer Entzündung hinsichtlich der endothelialen Ceramidgenerierung eine Differenzierung zwischen (a) der Aktivität bereits in das Serum sezernierter sSMPD1 im Unterschied zur (b) autokrinen Aktivität lokal-endothelial sezernierter sSMPD1 durchführen?

Insbesondere sollte untersucht werden, ob die zellulären Veränderungen des Endothelzellverbands beim generalisierten Entzündungsprozess eine Konsequenz des erhöhten systemischen sSMPD1-Serumspiegels darstellen oder diese Veränderungen vornehmlich auf den erhöhten proinflammatorischen Zytokinstatus des kritisch kranken Patienten zurückzuführen sind?

**(3)** Wie präsentieren sich quantitative und qualitative Effekte des proinflammatorisch veränderten Sphingomyelin-Metabolismus am Endothel und in welchem Ausmaß können diese durch die Inhibitoren Desipramin und NB6 reduziert werden?

Die Beantwortung der formulierten Fragestellungen stellt dabei eine wichtige Grundlage für ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen bei generalisierten Entzündungsprozessen dar. Aus diesem Grund ist eine genauere Analyse der inflammatorischen Stressantwort des Endothelzellgewebes ein zentraler Aspekt unserer Untersuchungen. In diesem Zusammenhang ist es von großem Interesse, ob sich ein aktivierter systemischer sSMPD1-Status durch verstärkte Ceramidgenerierung direkt in endothelialer Stimulierung und Einleitung pathophysiologischer Vorgänge niederschlägt. Da die Endotheldysfunktion ein fulminantes intensivmedizinisches Problem darstellt, welches oft in DIC und MODS mündet, ist die Suche nach Methoden, die die Entstehung dieses Zustandes verhindern, von großer klinischer Bedeutung. Dementsprechend möchten wir überprüfen, ob eine Modulation der Aktivität der sezernierten Form der sauren Sphingomyelinase dazu beitragen kann, potentielle Strukturen mit protektiver Wirkung auf die Endothelfunktion für pharmakologische Interventionstherapien vorzuschlagen. Ein weiterer Aspekt ist die genauere Untersuchung des dynamischen Verhaltens von membranständigem Ceramid und dessen Derivate bei proinflammatorischer Stimulation im dysfunktionellen Endothel. Die Entstehung ceramidreicher, signalaktiver Membrandomänen im Zusammenhang mit gesteigerter sSMPD1-Aktivität bei systemischen Inflammationszuständen würde demnach einen weiteren Nachweis des proapoptotischen Potentials der sSMPD1 sowie des verstärkt generierten Ceramids darstellen. Schließlich ergibt sich die interessante Fragestellung, ob eine Hemmung der Entstehung ceramidreicher Membrandomänen die Aggregation zahlreicher signalaktiver Todesrezeptoren beeinflusst, inwiefern dies Einfluss auf das Schicksal der Zelle entwickelt und zum besseren Verständnis über pathophysiologische Mechanismen des Multiorganversagens beiträgt. Die Untersuchung der Fragestellungen zur Verifizierung der Arbeitshypothese wurde an humanen mikrovaskulären Endothelzellen durchgeführt, welche ein adäquates *in vitro*-Modell darstellen, um systemische Entzündungszustände und proinflammatorische Effekte auf metabolischer und mikroskopischer Ebene zu analysieren.



## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Verwendete Materialien**

Chloroform p.a., Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe  
Zinksulfat, Sigma-Aldrich GmbH, München  
Nonidet (NP) 40 Puffer, SIGMA-Aldrich GmbH, München  
Methanol p.a., Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe  
Ammoniak, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz (25%)  
C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin, Invitrogen GmbH, Karlsruhe  
Natriumacetatlösung p.a. (100mM; pH 5,5), MERCK KGaA, Darmstadt  
DC Alufolien 20x20cm Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, MERCK KGaA, Darmstadt  
VECTASHIELD H-1000, Vector Laboratories, Inc. CA, USA  
Sphingomyelinphosphodiesterase EC 3.1.4.12, SIGMA-Aldrich GmbH, München  
Rottlerin (Mallotoxin), CALBIOCHEM/Merck KGaA, Darmstadt  
Brefeldin A, CALBIOCHEM/Merck KGaA, Darmstadt  
Desipramin, SIGMA-Aldrich GmbH, München  
NB6, Professor H.P. Deigner, Ladenburg  
Fas-Ligand/ TFNSF6 (human, rekombinant), R&D Systems Inc., Minneapolis, USA

### **3.2. Verwendete Geräte und Software**

Laser Scanning Mikroskop LSM 510 meta<sup>®</sup>, Carl Zeiss GmbH, Jena  
Vortex Genie 2 <sup>TM</sup>, Scientific industries, Bohemia, N.Y., USA  
Wasserbad, GFL mbH, Burgwedel  
DC-Kammern  
SPD 111 SpeedVac, Thermo savant, Holbrook, N.Y., USA  
Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg  
Laminarbox Herasafe, Heraeus Instruments, Hanau  
Labor-pH-Meter: inoLab pH Level 2, WTW GmbH, Weilheim  
Fujifilm FLA 5000, Fuji-Raytest GmbH, Berlin  
Aidasoftware Version 3.52.046  
Carl Zeiss LSM Image Examiner<sup>®</sup> und Image Browser<sup>®</sup> Version 3,5,0,376  
Microsoft Excel 2003, SPSS 13.0, Origin 7.0 SR0

### **3.3. Verwendete Lösungen und Medien**

#### **MCDB-131 Kultivierungsmedium**

MCDB-131 (GIBCOM) gilt als standardmäßiges Nährmedium für humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) und wurde bei allen Kultivierungen und Stimulationsversuchen verwendet. Zur Herstellung des MCDB-131 Kultivierungsmediums wurde das MCDB-131 Ausgangsmedium zusätzlich mit 1% Glutamax, 1% Streptomycin/Penicillin sowie 10% FCS supplementiert.

#### **Saurer Inkubationspuffer**

62ml 100mM Natriumacetat-Lösg. wurden 8ml 0,1% NP40-Puffer/100mM Natriumacetat sowie 5ml 2mM Zinksulfat-Lösg./100mM Natriumacetat hinzugefügt und mit  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaOH}$  auf pH 5,0 titriert.

#### **NBD C<sub>6</sub>-Sphingomyelin**

1mg C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin wurde mit 1080µl 100mM Natriumacetat/0,1% NP40-Puffer (pH 5) resolublisiert, bei Maximum gevortext und in 54 Aliquots zu je 20µl bei -34°C gelagert. Die resultierende C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelinkonzentration beträgt 1,25mmol/l.

#### **Dünnschichtchromatographie (DC)-Laufmittel**

Das in den DC-Kammern verwendete Laufmittel bestand aus einem Gemisch aus 65ml Chloroform, 25ml Methanol und 4ml 2M Ammoniak-Lösung (aq) (Dobrowsky und Gazula 2000). Durch mehrmaliges kräftiges Schütteln mit Druckausgleich wurde eine Mischung bei Umgebungsdampfdruck sichergestellt.

#### **Brefeldin A Stammlösung**

Um eine 400µM Brefeldin A-Stammlösung zu erhalten, wurden 5mg Brefeldin A in 1ml HBSS-Puffer aufgenommen und diese Lösung im Verhältnis 1:50 (v/v) in RPMI verdünnt.

#### **NB6 Stammlösung**

Zur Erzeugung einer 800µM NB6 Stammlösung erfolgte die Suspensierung von 11,9mg NB6 in 800µl DMSO mit anschließender Verdünnung in HBSS im Verhältnis 1:50 (v/v).

### **Desipramin Stammlösung**

Für den Erhalt einer 800 $\mu$ M Desipramin Stammlösung wurden 9,7mg Desipramin-Hydrochlorid in 800 $\mu$ l H<sub>2</sub>O (3fach dest.) aufgenommen und dieses Gemisch im Verhältnis 1:50 (v/v) in HBSS verdünnt.

### **Rottlerin Stammlösung**

Die Herstellung einer 1mM Stammlösung des Proteinkinase-C- $\delta$ -Inhibitors Rottlerin (Mallotoxin) erfolgte mittels Lösung von 5,2mg Rottlerin in 1000 $\mu$ l DMSO und anschließender Verdünnung in RMPI im Verhältnis 1:10 (v/v).

## **3.4. Versuchsdurchführung**

### **3.4.1. HMEC-1 Zellkultivierung**

Bei -196°C asservierte HMEC-1-Aliquots (CDC, Atlanta, Georgia) wurden im 37°C temperierten Wasserbad rasch aufgetaut, in 10ml MCDB131-Ausgangsmedium aufgenommen (vorgewärmt auf 37°C) und für den Zeitraum von 4min mit 400xg bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde beim Überführen in eine Zellkulturflasche mit 25cm<sup>2</sup>-Wachstumsfläche in 6ml MCDB-131 Kultivierungsmedium gelöst, welches anschließend mit 0,1% EGF (10 $\mu$ g/ml) und 0,5% Hydrokortison (200 $\mu$ g/ml) versehen wurde.

Die Langzeitinkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Inkubator. In Abhängigkeit der Bildung eines konfluenten HMEC-1-Monolayers wurden die Zellen alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:3 für eine weitere Passage gesplittet. Hierzu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die adhärennten Endothelzellen mit HBSS-Puffer gewaschen und mit 1ml Trypsin bei 37°C im Zellbrutschrank abgelöst. Nach vierminütiger Inkubation wurde der enzymatische Trypsinisierungsprozeß durch Zugabe von 5ml MCDB 131 Kultivierungsmedium abgestoppt. Je 2ml der Zelllösung wurden in 3 neue 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen überführt und mit dem Kultivierungsmedium auf 6ml je Flasche aufgefüllt.

### **3.4.2 Metabolisches Labelling von HMEC-1 mit C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin**

Konfluente HMEC-1 Monolayer wurden in der 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche trypsinisiert, anschließend mit 11ml MCDB-131-Ausgangsmedium resuspensiert und auf eine 12-well-

Zellversuchsschale ( $A_0=3,9\text{cm}^2/\text{well}$ ) überführt ( $V=1\text{ml}/\text{well}$ ). Um die für Stimulationsversuche nötige Konfluenz und Adhärenz zu erreichen, wurden die Endothelzellen in der Versuchsschale zum Wachstum für 2 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  im Zellbrutschrank belassen. Die versuchsbereiten HMEC-1 wurden vor Beginn des Labellings einem erneuten Mediumwechsel mit MCDB-131 ( $V=900\mu\text{l}/\text{well}$ ) unterzogen.

Nach Auftauen des zum Labelling notwendigen  $\text{C}_6\text{-NBD-Sphingomyelin-Aliquots}$  wurde zur Lösungsmittelentfernung der im Tube enthaltene Puffer in der Vakuumzentrifuge für 10min bei  $40^\circ\text{C}$  evaporisiert. Nach Zugabe von  $1200\mu\text{l}$  MCDB-131 Ausgangsmedium und anschließendem Vortexen erfolgte die Resuspension des  $\text{C}_6\text{-NBD-Sphingomyelin-Pellets}$  im Tube.

Zum Endothelzell-Labelling wurde pro 12-well Zellversuchsschale ein Tube mit  $\text{C}_6\text{-NBD-Sphingomyelin-Aliquot}$  aufbereitet und dieses in einem Verhältnis von  $100\mu\text{l}/\text{well}$  dem Zellrasen zugeführt. Das Endvolumen des fertigen Inkubationsmediums betrug  $1000\mu\text{l}/\text{well}$  entsprechend einer  $\text{C}_6\text{-NBD-Sphingomyelin}$  Endkonzentration von  $0,1\mu\text{mol/l}$ . Um einen hinreichenden Einbau des fluoreszierenden  $\text{C}_6\text{-NBD-Sphingomyelins}$  in die Endothelzellmembran zu gewährleisten, wurde der Inkubationszeitraum auf 2h bei  $37^\circ\text{C}$  im Zellbrutschrank definiert. Der beschriebene Prozess des endothelialen metabolischen Labellings und der daraus resultierende Zustand der Integration von  $\text{C}_6\text{-NBD-Sphingomyelin}$  in der HMEC-1-Zellmembran galt als Grundlage für weitere Stimulationsversuche.

### **3.4.3. Charakteristik und Aufbereitung von Patientenserum und Kontrollserum**

Um bei Messungen der sSMPD1-Aktivität im Serum und der sSMPD1 Aktivität nach Endothelzellstimulation vergleichbare Ergebnisse formulieren zu können, wurden Blutproben eines 12 Personen umfassenden Patientenkollektivs sowie Blutproben eines gleichstarken Kollektivs gesunder Probanden untersucht. Grundlage für Einschluss in die Patientengruppe war die klinische Diagnose: „Sepsis mit mindestens einem Organversagen“ (schwere Sepsis). Die Entnahme des Patientenblutes erfolgte innerhalb von 24h nach Erstellung der Erstdiagnose. Die Asservierung erfolgte im 10ml Serumröhrchen, welches nach Möglichkeit sofort oder nach kurzer Lagerung im Kühlraum ( $+4^\circ\text{C}$ ) unmittelbar verarbeitet, d.h. bei  $1000\text{xg}$  abzentrifugiert und in Aliquots zu je  $300\mu\text{l}$  bei  $-80^\circ\text{C}$  konserviert wurde.

#### **3.4.4. Endothelzellstimulationsversuch mit Serum septischer Patienten**

Die nach 3.4.2. vorbereiteten und metabolisch markierten Zellen wurden nach kurzer lichtmikroskopischer Konfluenzprüfung dem folgenden Stimulationsschema unterzogen. Vor Serumzugabe zu den gelabelten HMEC war es notwendig, den bisherigen Zellüberstand zu entfernen, anschließend mit HBSS-Puffer zu waschen und mit neuem MCDB-131 Ausgangsmedium (V=950µl) zu ersetzen. Dadurch wurde gewährleistet, dass der Zellüberstand frei von überschüssigem C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin war, um einer eventuellen Ergebnisverfälschung bei Serumzugabe vorzubeugen. Bei -80°C gelagerte Serumproben wurden langsam auf Eis aufgetaut und den HMEC der 12-well Zellversuchsschale zugegeben. Dem 950µl umfassenden Zellüberstand wurden 50µl Serum je well hinzugefügt, sodass die effektive Serumkonzentration 5% betrug. Nach Ablauf einer zeitlich definierten Inkubation im Zellbrutschrank wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Nach anschließendem Waschvorgang wurden die Endothelzellen nach 4 minütiger Trypsinwirkung (200µl/well) mittels Cellscraper abgelöst sowie nach Zugabe von 300µl Methanol je well in Tubes aufgenommen und bei -80°C zwischengelagert. Um einen Einblick in die zeitliche Dynamik des Sphingomyelinmetabolismus während der Endothelzellstimulation zu gewinnen, wurden die nach diesem Modell bearbeiteten Endothelzellen in einer unabhängigen Versuchsreihe mit Serum stimuliert und zu den Zeitpunkten: 15min, 30min, 60min und 120min asserviert und analysiert. In einer Doppelbestimmung wurde in diesem Assay die Wirkung auf die unstimulierten Endothelzellen mittels Serum von 12 Patienten mit klinischer Diagnose „schwere Sepsis“ sowie 12 Kontrollseren untersucht.

#### **3.4.5. Inhibitorstudien der Endothelzellstimulation**

Das in 3.4.4. beschriebene Modell der Endothelzellstimulation wurde in weiteren Versuchsansätzen durch den Einsatz eines bekannten, und eines neuen, näher zu untersuchenden niedermolekularen Inhibitors der SMPD1 konkretisiert. Zum Einsatz kamen Desipramin aus der Gruppe der trizyklischen Antidepressiva (Hurwitz, Ferlinz et al. 1994), (Kolzer, Werth et al. 2004), sowie das synthetische Carbazol-Derivat NB6 (Claus, Bunck et al. 2005). Dabei wurde in einer jeweils separaten Versuchsreihe der jeweilige Hemmstoff der sauren Isoform der Sphingomyelinase den HMEC-1 30min vor Hinzugabe des Patienten/Kontrollserums zugeführt, in der Konzentrationsreihe: 10µM, 20µM, 40µM. Durch anschließendes Beifügen des Serums zu den in unterschiedlichen Konzentrationen vorinkubierten Endothelzellen je well wurde der Stimationsversuch wie bereits beschrieben fortgeführt. Die Stimulationsdauer wurde hierbei auf 20min festgelegt.

In weiteren Versuchen wurde der inhibitorische Einfluss des Makrolid-Antibiotikums Brefeldin A (BFA) sowie die Effekte des PKC- $\delta$ -Inhibitors Rottlerin bezüglich endothelialer sSMPD1-Syntheseleistung anhand C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-Umsatzbestimmung sowie konfokalmikroskopischer Intensitätsbestimmung untersucht. Hierbei wurden die versuchsbereiten Zellen im well jeweils mit 20 $\mu$ l einer 400 $\mu$ M BFA-Lösung oder 10 $\mu$ l einer 1mM Rottlerin-Lösung 30min vor Zugabe des zu untersuchenden Serums inkubiert.

#### **3.4.6. Serumaktivitätsbestimmung der sSMPD1**

Zur Analyse der Serumaktivität der sezernierten Sphingomyelinase wurden Serumproben von Patienten mit klinischer Diagnose „schwere Sepsis“ und Proben von Kontrollpatienten langsam auf Eis aufgetaut. Es erfolgte die Hinzugabe von 160 $\mu$ l sauren Inkubationspuffer (pH 5) zu 10 $\mu$ l Serumprobe im Eppendorf-Tube. Ein C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-Aliquot wurde im SpeedVac lösungsmittelfrei abrotiert und das Lipidpellet mit 1000 $\mu$ l 100mM Natriumacetat/0,1% NP40-Puffer (pH 5) aufgefüllt und resuspensiert. Durch Zugabe von 40 $\mu$ l der Sphingomyelin-Suspension zu den im Eppendorf-Tube befindlichen Substanzen wurde der Reaktionsansatz fertig gestellt. Die Konzentration des C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-Fluorophors im fertigen Ansatz lag bei 5 $\mu$ M. Nach zweistündiger Inkubation im 37°C temperierten Wasserbad wurden die Proben per Lipidextraktion direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C aufbewahrt.

#### **3.4.7. Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie**

Der Ablauf der Lipidextraktion entspricht in Grundzügen der Methode nach Bligh und Dyer (Bligh und Dyer 1959). Leichte Modifikationen erfolgten bezüglich eingesetzter Volumina.

Die nach Endothelzellstimulation gewonnenen Proben, deren lysiertes Zellpellet bereits in 300 $\mu$ l Methanol und 200 $\mu$ l Trypsin suspensiert vorliegt, erhielten nach Auftauen auf Eis den Zusatz von 600 $\mu$ l Chloroform sowie zur Phasentrennung 100 $\mu$ l Aqua (3fach dest.). Den bei der Serumaktivitätsbestimmung der sSMPD1 asservierten und ebenfalls aliquotierten Reaktionsansätzen wurde ein Gemisch, bestehend aus 500 $\mu$ l Chloroform und 250 $\mu$ l Methanol, zugesetzt. Ab diesem Punkt wurde für sämtliche Extraktionsgemische eine einheitliche Methodik angewandt. Zur vollständigen Durchmischung wurden die Extraktionsansätze für 1min bei Maximum gevortext. Die anschließende, zur Phasendarstellung nötige Zentrifugation wurde bei 1000xg und 4°C für 15min durchgeführt. Im folgenden Schritt wurde die untere Chloroform-/Methanolphase entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur optimalen Ausschöpfung der fluoreszierenden

Lipidfraktion wurde der Extraktionsablauf, bestehend aus Vortexing, Zentrifugation und Substanzgewinnung nach erneuter Zugabe von 300µl Chloroform wiederholt. Das somit aus der doppelten Lipidextraktion gewonnene Produkt enthielt als lipophile Phase unter anderem die zu analysierende, fluoreszierende Sphingomyelin/Ceramidfraktion, welche bei folgender, 80minütiger, lichtverminderter Vakuumevaporisation als Lipidpellet im Tube erkennbar wurde. Nach Resuspension mit 20µl Methanol und Vortexing wurde der Lipidextrakt in weiteren Schritten dünnschichtchromatographisch analysiert. Hierzu wurden die Laufkammern mit 94ml fertigen Laufmittel versetzt und DC-Kieselgel-Platten im Format 10cm x 20cm vorbereitet. Nach 4 minütiger Zentrifugation bei 1000xg konnte der Lipidextrakt auf die Kieselgelplatten aufgetragen werden, welche nach kurzer Trocknungszeit in der DC-Kammer bei Kammersättigung entwickelt wurden. Die bis zum Abschluss des Vorgangs erforderliche, einheitliche Laufhöhe betrug 9+0,5cm. Nach 10minütiger Trocknung erfolgte das fluoreszenzoptische Scannen der DC-Platten am Fluoreszenzlight-Analyzer unter folgenden Analyseparametern:

Wellenlänge: 473nm, Verstärkung: 300V, Filter: LBP, Auflösung: 100µm.

Eine anschließende fluoreszenzdensitometrische Auswertung erfolgte mittels 2D Evaluation des Programms AIDA (Vers. 3.52.046).

### 3.5. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen stimulierter Endothelzellen

#### 3.5.1. Verwendete Antikörper

Die Markierung von speziell unter inflammatorisch-apoptotischen Bedingungen interessanten Endothelzellepitopen, wie dem CD95-Rezeptor (Fas), dem als Lipid-raft-Marker beschriebenen Gangliosid-GM<sub>1</sub> (Kiyokawa, Baba et al. 2005) sowie Ceramid und SMPD1 erfolgte nach dem Prinzip der Einzel oder Doppelfärbung. Die Markierung des Gangliosid-GM<sub>1</sub>-Epitops wurde in einer Einzelfärbung nach der Methode des primären Antikörperstainings durchgeführt. Hierbei koppelt der gegen das humane Epitop gerichtete Antikörper das zu beobachtende Fluoreszenzsignal direkt. Die übrige Antikörpermarkierung (CD95, Ceramid, SMPD1) erfolgte nach dem Sandwich-System, wobei ein gegen den primären Antikörper gerichtetes, Fluoreszenzfarbstoff tragendes, sekundäres Immunglobulin reagiert und mikroskopisch ausgewertet wurde. Die genaue Bezeichnung der eingesetzten Antikörper ist in Tabelle 1 aufgeführt sowie deren Einsatz am HMEC-1-Modell in Abb. 3 schematisch dargestellt.

#### Verwendete Primärantikörper:

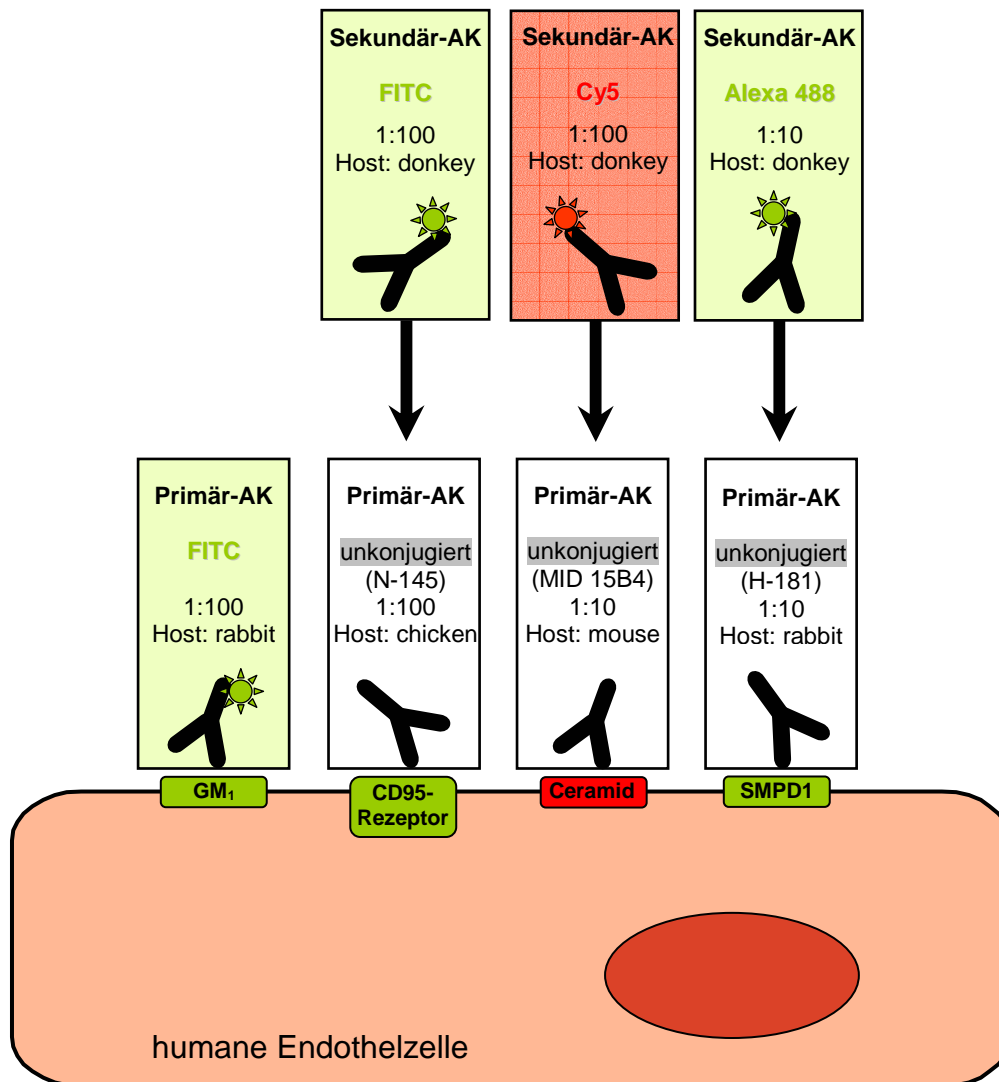
- Anti human Gangliosid GM<sub>1</sub>, Cholera-Toxin B Primärantikörper, FITC-konjugiert, Host: rabbit
- Anti human CD95 (Anti-Fas), polyklonaler Primärantikörper (N-145), unkonjugiert, Host: chicken
- Anti human Ceramid, monoklonaler Primärantikörper (MID 15B4), unkonjugiert, Host: mouse
- Anti human SMPD1, polyklonaler Primärantikörper (H-181), unkonjugiert, Host: rabbit

#### Verwendete Sekundärantikörper:

- Anti chicken IgY, polyklonaler Sekundärantikörper, FITC-konjugiert, Host: donkey
- Anti mouse IgG, monoklonaler Sekundärantikörper, Cy5-konjugiert, Host: donkey
- Anti rabbit IgG, monoklonaler Sekundärantikörper, FITC-konjugiert, Host: donkey

**Tab.: 1 Antikörperschema.** Tabellarische Aufführung eingesetzter Primärantikörper mit Angabe des Antigens, der Klonalität sowie Konjugation und Hostgattung. Verwendete Sekundärantikörper werden durch Benennung der Antigengattung, der betreffenden Immunglobulin-Klasse, des Konjugats sowie der Hostgattung näher charakterisiert.



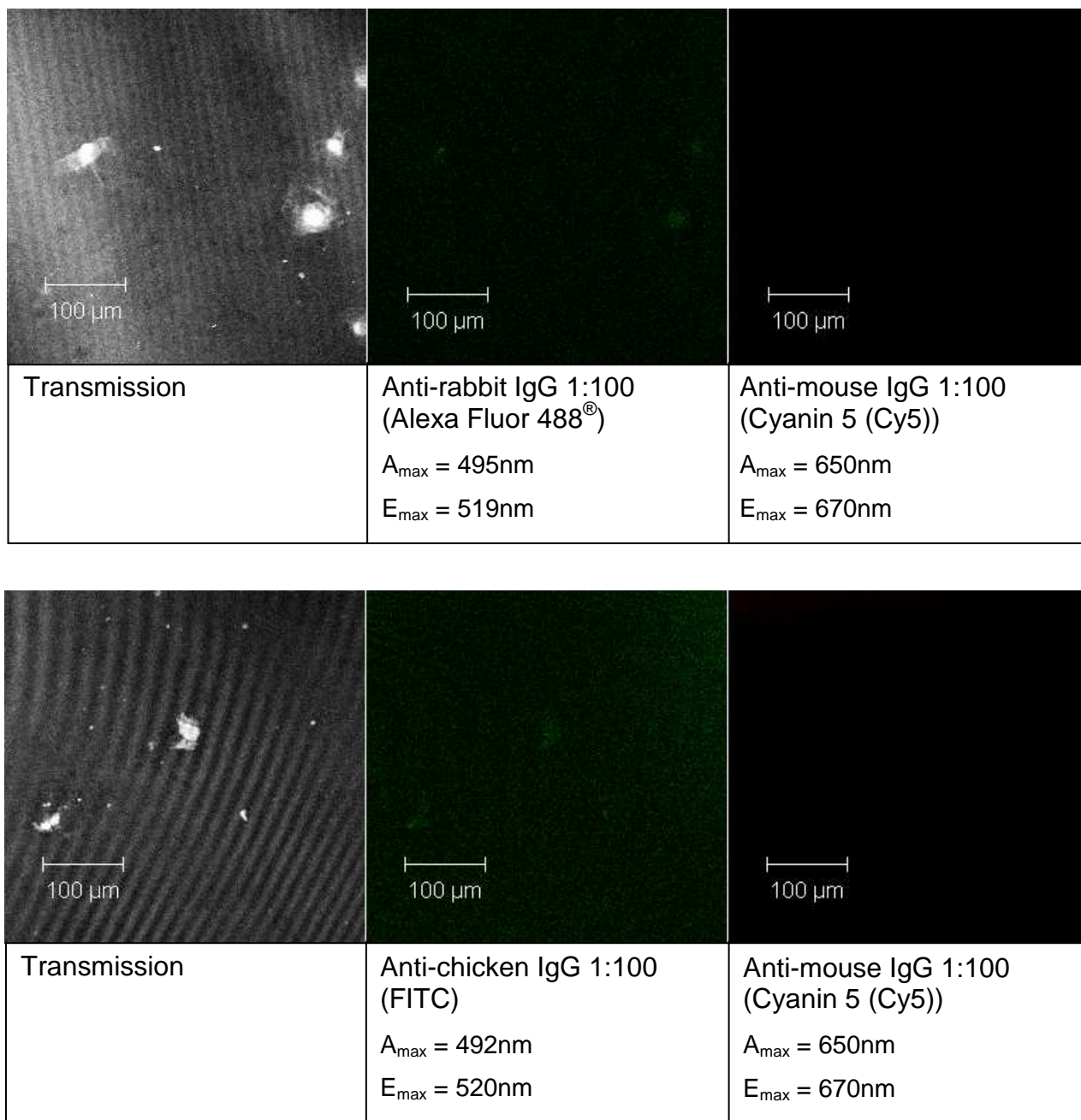


**Abb. 3: Markierungs-Schema eingesetzter Antikörper.** Angegeben sind Konzentration, Host und genaue Bezeichnung des Antikörpers. Zusätzlich wurde durch Farbmarkierung der konjugierte Fluorophor dargestellt und charakterisiert (FITC, Cy5). Als Zielstrukturen wurden unterschiedliche, membranständige Epitope der im Zellkulturmodell verwendeten HMEC-1 visualisiert.

### 3.5.2 Antikörperstaining von Endothelzellepitopen

Unter keimfreien Bedingungen wurde eine 12well Zellversuchsschale mit in 99%igen Ethanol getränkten und unter Gasbrennerflamme sterilisierten 20 x 20mm Deckgläsern je well präpariert. Es erfolgte ein Überführen konfluenten HMEC-1 in die vorbereitete Versuchsschale mit anschließender 1-2 tägiger Inkubation bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> im Zellbrutschrank. Nach subkonfluentem Anwachsen der Endothelzellen auf dem Deckglas erfolgte die zeitabhängige Stimulation mit Patientenserum versus Kontrollserum.

Nach Beendigung des Stimulationsversuches und anschließendem Verwerfen des Zellüberstands, wurde jedes well mit darin gelagerten Deckgläsern zur nötigen Fixation mit einer 5%igen Paraformaldehydlösung (in HBSS) für 30min versehen. Nach kurzem Waschvorgang mit HBSS-Puffer wurden die auf dem Deckglas adhärennten HMEC-1 für 5min mit 50µl einer 1%igen BSA-Lösung (in HBSS) inkubiert, um unspezifische, zelluläre Bindungen zu blockieren. Im nächsten Schritt erfolgte die Konfrontation des Präparats mit 50µl des in der jeweils optimalen Konzentration ermittelten Primärantikörpers, welcher ebenfalls in 1%iger BSA-Stocklösung (in HBSS) aufgenommen wurde. Dieser Prozeß erfolgte über einen Zeitraum von 12h bei +4°C und weitestgehendem Lichtausschluß im Kühlraum. Nach sorgfältigem Waschen mit HBSS-Puffer wurde das sekundäre Antikörperstaining der Endothelzellen durchgeführt. Hierbei wurde das Präparat über einen Zeitraum von 3h mit 50µl des ebenfalls in 1% BSA-Lösung (in HBSS) verdünnten Sekundärantikörpers inkubiert. Daraufhin erfolgte ein weiterer, gründlicher Waschvorgang mit HBSS-Puffer und Aqua (3fach dest.), mit abschließender Fixation der markierten Deckgläser mittels Vecta-Shield auf vorbereiteten Objektträgern. Die Auswertung der Präparate erfolgte mittels Carl Zeiss Konfokalmikroskop LSM 510 meta<sup>®</sup>. Die Visualisierung einzelner Endothelzellen wurde in 400facher Vergrößerung (Plan-Neofluor Objektiv 40x/0,75) realisiert, zur übersichtlichen Darstellung des Endothelzellverbands diente ein Plan-Apochromat 20x/0,75 Objektiv, welches eine 200fache Vergrößerung erzielte. Die Lochblenden-Einstellung (*pinhole*) des Mikroskops wurde bei jedweder Auswertung als Konstante von 1,00 *Airy unit* (benannt nach Sir George B. Airy, 1801-1892) definiert. Der Einsatz der Fluoreszenzfilter erfolgte im grünen Kanal (FITC, Alexa 488<sup>®</sup>) durch Auswahl eines Bandpass-505-530nm-Filters, die Darstellung von Cy5 gelabelten Antikörpern im roten Kanal wurde mit einem Longpass-650nm-Filter durchgeführt. Zum Ausschluss unspezifischer Fluoreszenzeffekte wurden die eingesetzten Sekundärantikörper auf Kreuzreaktionen untereinander sowie auf Interaktionen zu den Endothelzellen getestet (Abb. 4).



**Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopischer Spezifitätsnachweis eingesetzter Sekundärantikörper.**

Ausschluss unspezifischer Kreuzreaktivität fluoreszierender Sekundärantikörper am humanen *in vitro* Endothelzellmodell. Subkonfluent gewachsene HMEC-1 wurden 30min in 5%igem Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Im Gegensatz zum beschriebenen Arbeitsprotokoll (3.5.2) wurde der korrespondierende primäre Antikörper nicht eingesetzt. Die einzelnen Kanäle konfokalmikroskopischer Bilder verdeutlichen einerseits die nicht vorhandenen Interaktionen zwischen Antikörper und Endothelzelle sowie die nicht vorherrschende Kreuzreaktivität der Antikörper untereinander (*overlay*). Schwach sichtbare Signale im grünen Kanal können als vernachlässigbare Antikörperreaktion gewertet werden oder geben Hinweis auf minimale physiologische Autofluoreszenz der Zelle (FADH/NADH). Aufgeführte Antikörper werden durch Beschreibung des spezifischen Antigens, der eingesetzten Verdünnung sowie der maximalen Anregungs- und Emissionswellenlänge des fluoreszierenden Konjugats konkretisiert. Vergrößerung 200fach, Balken entspricht 100μm. Repräsentative Darstellung drei unabhängiger Experimente.

### **3.6. Statistische Auswertung und Ergebnispräsentation**

#### **3.6.1. Statistische Tests**

Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS 13.0.

##### **Normalverteilung**

Die Prüfung auf Normalverteilung der Werte eines Kollektivs erfolgte bei einer Stichproben-  
dimension von  $n < 20$  unter Verwendung des Shapiro-Wilk-Tests, bei Stichprobenstärke  $n > 20$  wurde auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Ein Unterschied wurde für  $p < 0,05$  als signifikant anerkannt.

##### **Statistik unabhängiger Werte**

Normalverteilte Mittelwerte von Kollektiven wurden unter Verwendung des t-Tests für ungepaarte Stichproben verglichen. Traf eine Normalverteilung der Mittelwerte nicht zu, so erfolgte eine statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test als parameterfreies Analyseverfahren. Unterschiede galten bei  $p < 0,05$  als signifikant.

##### **Statistik abhängiger Werte**

Sofern normalverteilt, wurden Mittelwerte von maximal 2 abhängigen Stichprobenkollektiven unter Einsatz des gepaarten t-Tests auf signifikante Gegensätze überprüft. Die statistische Auswertung nichtparametrischer, abhängiger Stichprobenkollektive ( $n > 2$ ) erfolgte mittels Friedmann-Test (Friedman 1925), welcher durch den Wilcoxon Rangsummentest (Wilcoxon 1945) verifiziert wurde. Zur Vermeidung der durch multiples Testen entstehenden  $\alpha$ -Fehler-Kumulation innerhalb der Gruppen wurden die Ergebnisse mittels Bonferroni-Holm Prozedur überprüft (Bonferroni 1936, Holm 1979). Bei genannten statistischen Verfahren wurde bei einem  $\alpha$ -Niveau  $< 0,05$  eine signifikante Abweichung konstatiert.

### 3.6.2. Ergebnispräsentation

Fluoreszenzmikroskopische Arbeiten wurden in originaler Bilddarstellung abgebildet, ohne digitale Nachbearbeitung des Hintergrundes sowie sonstiger Bildelemente.

Die Messergebnisse wurden mit Hilfe von Office Excel 2003 aufgearbeitet und mittels Origin 7.0 SR0 graphisch in Form von Punktdiagrammen oder *boxplots* präsentiert.

Die Darstellungsform der *boxplots* enthält folgende Komponenten:

- a) Die Dimension der *boxplots* erstreckt sich von dem 1.Quartil ( $Q_{25\%}$ ) bis zum 3.Quartil ( $Q_{75\%}$ ).
- b) Innerhalb der *boxplots* bezeichnet die waagerechte Linie den Median.
- c) Der Mittelwert wird durch leere Quadrate innerhalb der *boxplots* dargestellt.
- d) Der Wertebereich von der 5. Percentile ( $Pct_{5\%}$ ) bis zur 95. Percentile ( $Pct_{95\%}$ ) wird durch *whiskers* angezeigt.
- e) Werteausreißer sind durch  $\times$  dargestellt.

## 4. Ergebnisse

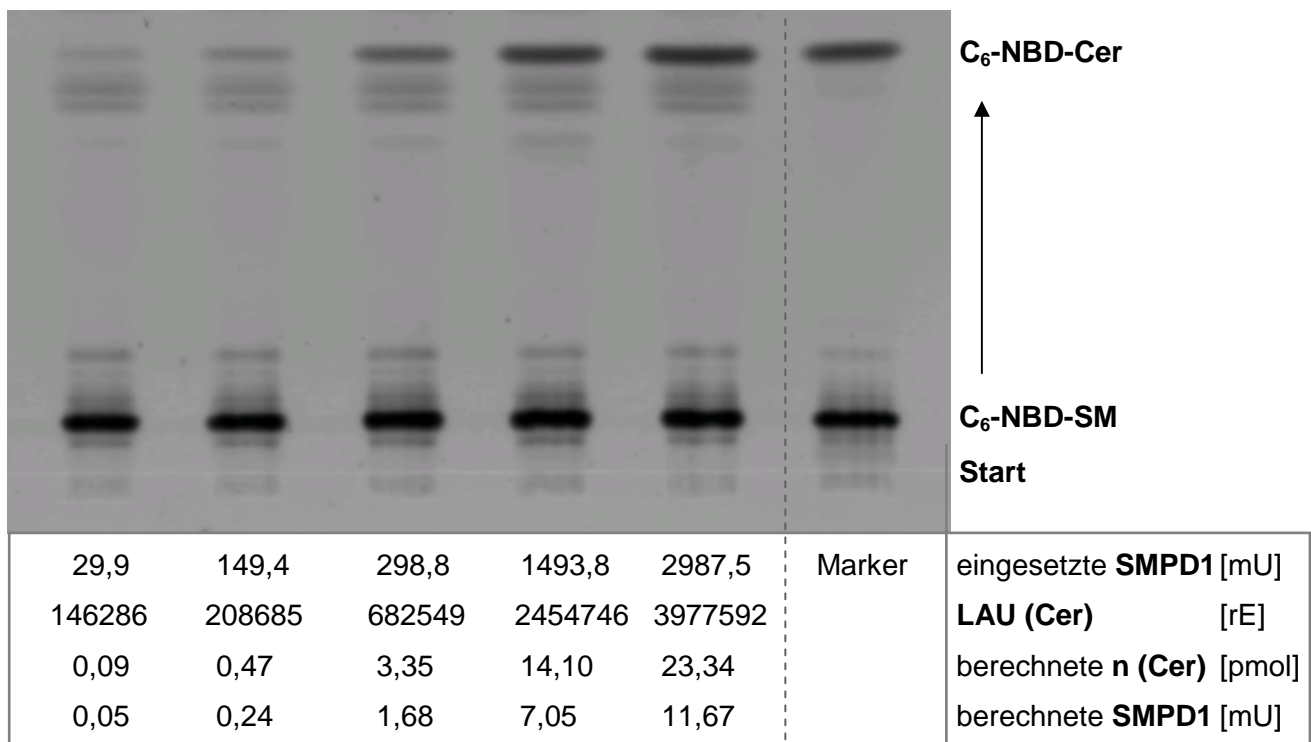
### 4.1. Voruntersuchungen

#### 4.1.1. Aktivitätsbestimmung der SMPD1 anhand Ceramidquantifizierung

Die Ermittlung der Enzymaktivität der sauren Sphingomyelinase erfolgte auf Basis einer standardisierten Methode (Claus, Bunck et al. 2005). Anhand der Quantifizierung des entstandenen Hydrolyseprodukts konnten direkte Aussagen über die Enzymaktivität formuliert werden. Dabei wurde die Absolutmenge der in der dünnschichtchromatographischen Auswertung entstandenen C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidfraktion densitometrisch analysiert und ins Verhältnis zur Serummenge und Inkubationszeit von 2h gesetzt. Eine lineare Funktion:  $y = 164800x + 131082$  ( $r^2=0,98$ ;  $n=50$ ) diene als arithmetische Grundlage der direkten Bestimmung der SMPD1-Enzymaktivität (Claus, Bunck et al. 2005). Für diese Untersuchungen erfolgte eine Betrachtung der SMPD1-Wirkung im sauren Milieu (pH 5, Zn<sup>2+</sup>-Konzentration: 2mM) unter idealen enzymatischen Reaktionsbedingungen. Die Angabe der Enzymaktivität erfolgte in mU sowie bei Volumen-bezogenen Berechnungen in pmol/(ml\*h).

Demgegenüber haben wir anhand eigener Beobachtungen unter Verwendung kommerziell erhältlicher SMPD1 (isoliert aus humaner Plazenta) überprüft, ob und inwiefern die im sauren Milieu beschriebene SMPD1-Wirkung auch unter physiologischen Bedingungen des Blutkreislaufs (pH 7,5; physiologische Zn<sup>2+</sup>-Konzentration) nachweisbar ist, da alle durchgeführten Endothelzell-Stimulationsversuche unter den beschriebenen, neutralen Reaktionsverhältnissen abliefen.

In diesem Fall stellt sich die SMPD1-Aktivität im neutralen Milieu als ungleich schwächer (~Faktor 200-600) gegenüber der Wirkung unter sauren Idealbedingungen dar. Jedoch lässt sich unter den von uns gewählten Reaktionsbedingungen ebenfalls ein positiver linearer Zusammenhang zwischen Umsatzrate und eingesetzter Enzymmenge ermitteln, wie in Abbildung 5 erkennbar wird.



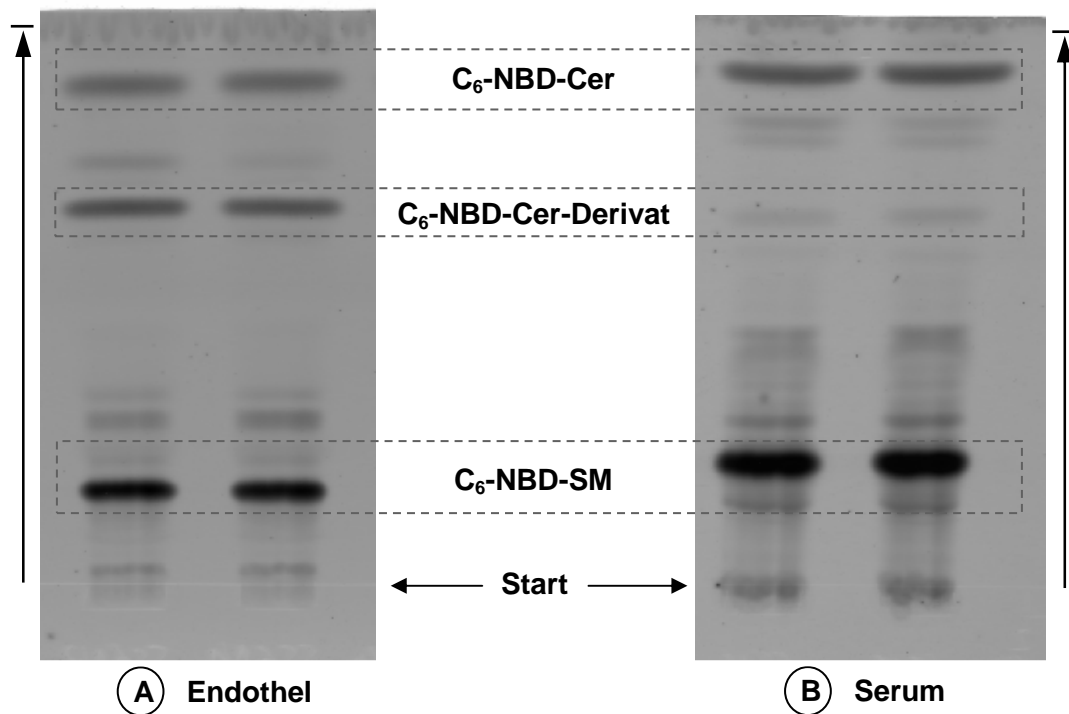
**Abb. 5: Darstellung SMPD1-induzierter Hydrolyse von C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin zu C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid bei pH 7,5.** Zuordnung der Banden erfolgt durch Vergleich mit markierten Standardverbindungen. Deutlich ist die Konzentrationsabhängigkeit der C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidgenerierung zu erkennen. Überschüssiges Substrat (C<sub>6</sub>-NBD-SM) ist durch eine prominente Bande mit geringem rf-Wert sichtbar. Angegeben ist in der ersten Zeile die bei pH 5 beobachtete Enzymaktivität der SMPD1 sowie die LAU (*light absorption units*) des generierten C<sub>6</sub>-NBD-Ceramids in relativen Einheiten und die daraus korrelierende C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid-Stoffmenge in pmol ( $r^2 = 0,98$ ). In der letzten Zeile ist die unter den gegebenen Reaktionsbedingungen (pH 7,5) berechnete SMPD1-Aktivität in mU aufgeführt.

#### 4.1.2. Auswertung spezifischer DC-Sphingolipidmuster

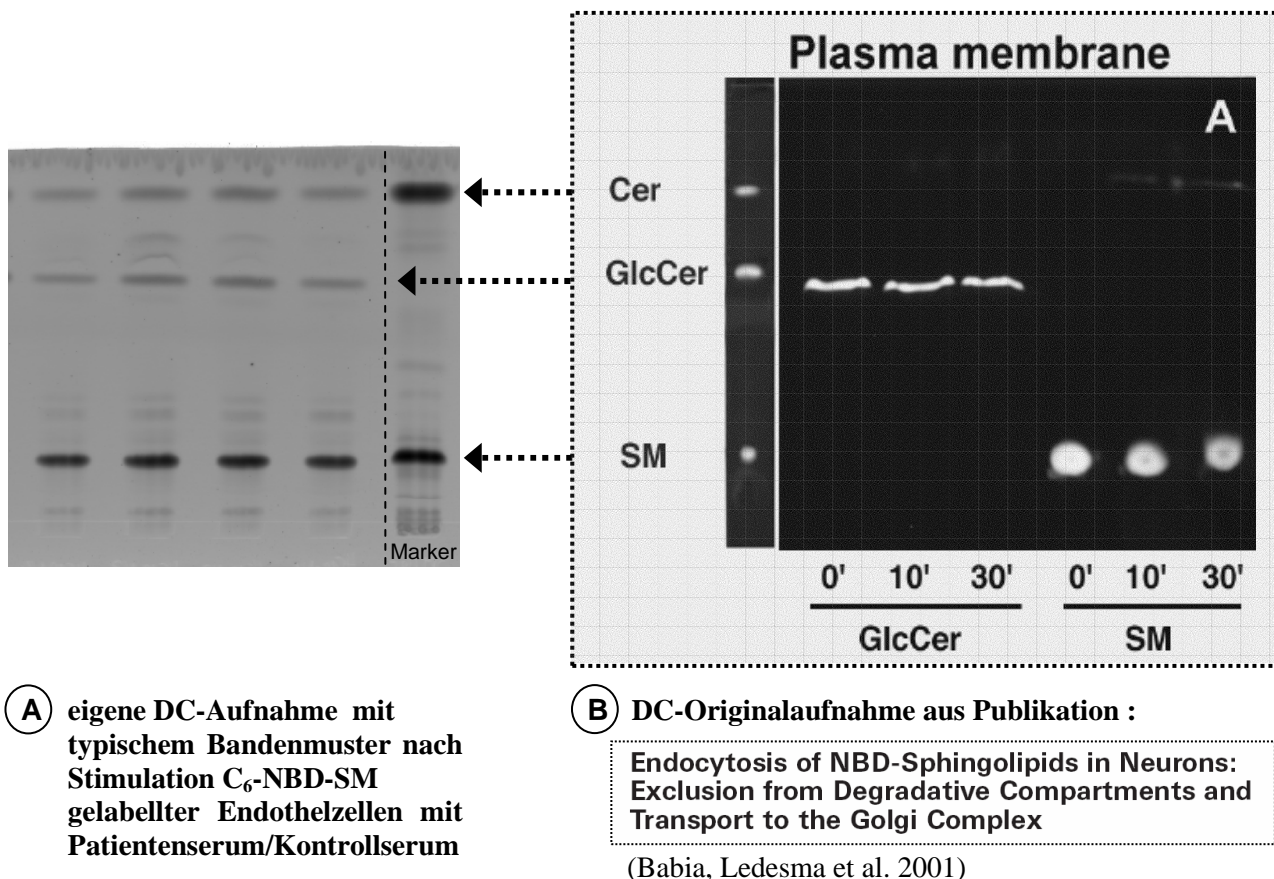
Beim Vergleich der dünnschichtchromatographischen Ergebnisse aus Endothelzellstimulationsversuchen und sSMPD1-Serumaktivitätsbestimmungen wurde für die fluoreszierenden Produkte der SMPD1-induzierten Sphingomyelinhydrolyse ein unterschiedliches, spezifisches Bandenmuster deutlich (Abb. 6). Durch Zuordnung zu kommerziell erhältlichen Vergleichssubstanzen konnte zunächst mittels Abgleich der resultierenden Laufhöhen eine hinreichende Identifizierung des markierten Substrats C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin sowie des Hydrolyseprodukts C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid bei beiden Versuchsansätzen (Abb. 6A Endothelzellstimulation; Abb. 6B sSMPD1-Serumaktivitätsbestimmung) erfolgen. Darüber hinaus präsentierte sich jedoch bei der DC-Auswertung der HMEC-1-Zellstimulationsversuche neben einigen schwachen, unspezifischen Banden eine zusätzliche, stärker fluoreszierende Bande, welche bei einem rf-Wert von ca. 0,6 lokalisiert wurde und sich bei der sSMPD1-Serumaktivitätsanalyse wesentlich schwächer bzw. kaum detektierbar darstellte. Aufgrund der geringeren Laufhöhe als C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid

sollte diese Struktur, die durch die beschriebene DC-Bande charakterisiert wird, molekulare Eigenschaften eines eher hydrophilen Sphingomyelinderivats aufweisen und könnte somit eine unspezifische C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid-Zucker-Verbindung repräsentieren. Obwohl eine genauere massenspektrometrische Aufschlüsselung im Rahmen dieser Arbeit noch nicht durchgeführt werden konnte, gelang eine plausible Identifizierung des unbekannten C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid-Derivats anhand kritischer Gegenüberstellung der von uns gewonnenen Ergebnisse mit dünnschichtchromatographischen Sphingolipidmustern verschiedener wissenschaftlicher Arbeiten, welche unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen erhalten wurden (Babia, Ledesma et al. 2001) (Grazide, Terrisse et al. 2004) (van Helvoort, Giudici et al. 1997). Der in Abbildung 7 präsentierte graphische Vergleich eigener Ergebnisse nach Endothelzellstimulation (Abb. 7A) gegenüber unveränderten DC-Originalaufnahmen der Forschergruppe Babia, Ledesma et al. (Abb. 7B) zeigt dabei identische Laufhöhen bei kongruentem Abstandsverhältnis der C<sub>6</sub>-NBD-Cer-Derivate auf beiden Abbildungen (Grazide, Terrisse et al. 2004). In Betracht dessen kräftigt dieser Vergleich unsere Hypothese, dass es sich bei dem zu untersuchenden fluoreszierenden Sphingolipid um C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid (engl.: *glycosylceramide*) handeln könnte. Weiterhin kann nachvollzogen werden, dass verschiedene Forschergruppen wie van Helvoort et al. oder Babia, Ledesma et al. bei der Erforschung intakter zellulärer Sphingomyelin-Stoffwechselvorgänge neben den zu erwartenden Hauptbanden C<sub>6</sub>-NBD-SM und C<sub>6</sub>-NBD-Cer lediglich C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid als einzig weitere detektierbare Struktur bei DC-Auswertungen identifizierten (Babia, Ledesma et al. 2001) (van Helvoort, Giudici et al. 1997). Die Tatsache, dass verschiedene wissenschaftliche Gruppen unter Verwendung der identischen Ausgangssubstanz (C<sub>6</sub>-NBD-SM) bei vergleichbaren Reaktionsbedingungen nahezu einheitliche, klar separierbare DC-Ergebnisse beschreiben, welche mit unserem DC-Muster kongruent sind, bekräftigt einerseits die Validität unserer dünnschichtchromatographischen Messmethode. Andererseits lässt sich anhand der beschriebenen Schlussfolgerungen der Nachweis der unbekannten, ausgeprägten Bande als C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid legitimieren. Um ein möglichst ganzheitliches Bild des HMEC-1-Sphingomyelinmetabolismus zu gewinnen, erschien es sinnvoll, neben dem Primärprodukt C<sub>6</sub>-NBD-Cer auch dieses zusätzliche, ebenfalls aus dem metabolischen Labelling resultierende, neue Hydrolyseprodukt ungeachtet seiner spezifischen Identifikation mit in weitere Untersuchungen einzubeziehen. Aufgrund eines weitestgehend sicheren, jedoch nicht ganzheitlichen Nachweises wurde C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid in nachfolgenden Grafiken mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet.





**Abb. 6: Darstellung differentieller DC-Sphingolipidmuster nach (A) Endothelzellstimulation und (B) sSMPD1-Serumaktivitätsbestimmung.** (A) Nach metabolischem HMEC-1-Labeling mit  $C_6$ -NBD-SM wurden die fluoreszenzmarkierten Endothelzellen mit Patientenserum/Kontrollserum stimuliert, zur (B) sSMPD1-Serumaktivitätsbestimmung erfolgte hingegen die direkte Inkubation von Patientenserum/Kontrollserum mit  $C_6$ -NBD-SM. Anschließend wurden die asservierten Proben der verschiedenen Versuchsansätze nach identischem Schema per Lipidextraktion separiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Bei beiden DC-Abbildungen wird die Ausgangssubstanz  $C_6$ -NBD-SM ( $rf \sim 0,2$ ) sowie das direkte Hydrolyseprodukt  $C_6$ -NBD-Cer ( $rf \sim 0,9$ ) deutlich erkennbar. Auf die Zuordnung der beiden Substanzen zu kommerziellen Standardprodukten, welche in weiteren Aufnahmen mehrfach aufgeführt sind, wurde in dieser Grafik verzichtet. Neben einigen schwach detektierbaren, als unspezifisch zu wertenden Banden auf beiden Aufnahmen wird in Abbildung (A) eine ausgeprägt fluoreszierende Struktur erkennbar ( $rf \sim 0,6$ ), welche sich bei Aufnahmen der Serumaktivitätsanalyse (B) nur sehr schwach oder nicht detektierbar darstellt. Repräsentative Aufnahmen aus jeweils  $> 30$  unabhängigen Experimenten.

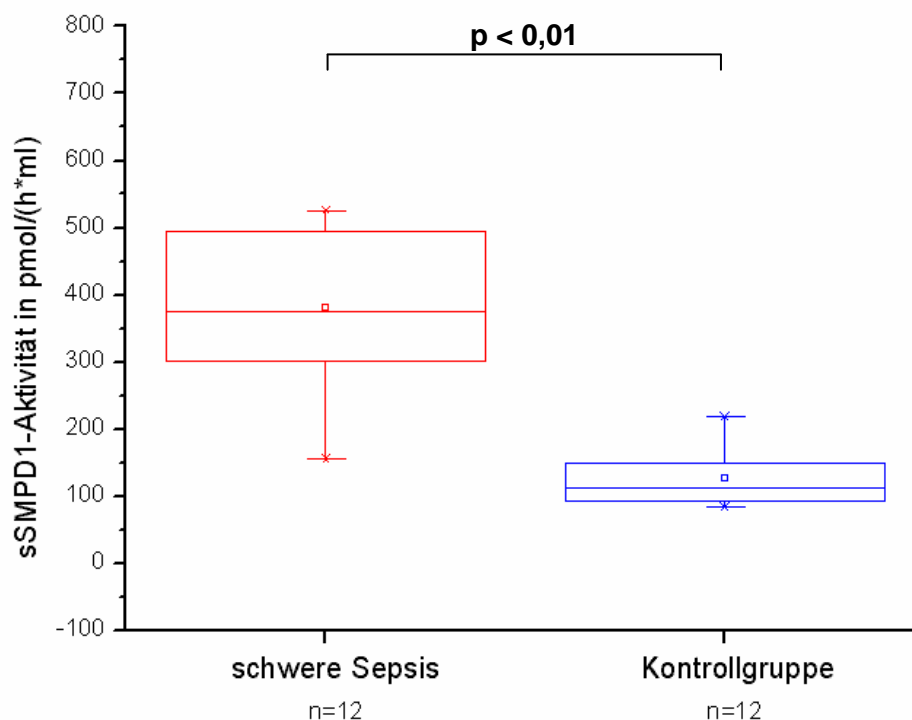


**Abb. 7: Graphischer Vergleich eigener (A) DC-Ergebnisse mit (B) dünnschichtchromatographischen Aufnahmen aus einer neuronalen NBD-Sphingolipidmetabolismus untersuchenden Publikation von Babia, Ledesma et al. 2001.** (A) Mit C<sub>6</sub>-NBD-SM metabolisch gelabelte Endothelzellen wurden mit Patientenserum/Kontrollserum stimuliert und nach Reaktionsablauf asserviert. Nach der anschließenden Lipidextraktion erfolgte die dünnschichtchromatographische Auswertung. Anhand aufgetragener, mitgelaufener Vergleichssubstanzen am rechten Bildrand (siehe auch Abb. 5) können die beiden Sphingolipide C<sub>6</sub>-NBD-SM und C<sub>6</sub>-NBD-Cer eindeutig zugeordnet werden. (B) Im unveränderten Originalbild aus der oben genannten Publikation ist ein DC-Bandenmuster aus Analysen des neuronalen Sphingolipidstoffwechsels dargestellt. Die am linken Bildrand aufgetragenen Standardsubstanzen C<sub>6</sub>-NBD-SM, C<sub>6</sub>-NBD-GlcCer, C<sub>6</sub>-NBD-Cer dienten dabei dieser Forschergruppe zur genauen Identifikation der dünnschichtchromatographisch separierten Sphingolipide. (A+B) Bei der Gegenüberstellung der beiden graphisch unveränderten Bilder wird zunächst die exakt gleiche Laufstrecke der Ausgangssubstanz C<sub>6</sub>-NBD-SM sowie des direkten Hydrolyseprodukts C<sub>6</sub>-NBD-Cer in beiden Settings unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen deutlich. Zusätzlich lässt sich eine übereinstimmende Lokalisation des bisher unbekannten C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid-Derivats unserer Aufnahmen (A) zu der als C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid (C<sub>6</sub>-NBD-GlcCer) beschriebenen Substanz aus (B) nachvollziehen. Diese relativ eindeutige Beobachtung, die anhand beliebiger weiterer eigener Aufnahmen bestätigt werden konnte, diente als plausible Grundlage zur weitestgehend sicheren Identifizierung dieses bisher noch zu untersuchenden Lipids in der vorliegenden Arbeit.

## 4.2. Untersuchungen der Serumaktivität der sSMPD1

### 4.2.1. Aktivität sezernierter Sphingomyelinase bei Patienten mit Sepsis

Als Grundlage weiterführender Zellstimulationsversuche wurde eine genauere Charakterisierung der im Serum befindlichen sSMPD1-Aktivität angestrebt. Dabei erfolgte eine Dreifachbestimmung der Serumaktivität eines 12 Personen umfassenden Patientenkollektivs sowie eines in Alter und Gruppengröße vergleichbaren Kollektivs gesunder Probanden. Nach positivem Shapiro-Wilk-Testergebnis auf Normalverteilung ( $\text{Sig} > 0,05$ ) wurden die Mittelwerte jeder Dreifachmessung durch den t-Test für unabhängige Stichproben analysiert. In der Gegenüberstellung zur Probandengruppe wies die Gruppe der Patienten mit Sepsis eine signifikant erhöhte Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase auf  $p < 0,01$  (Abb. 8). Dabei spiegelte die sSMPD1-Aktivität der Patientengruppe einen Median von 379,2 pmol/(ml\*h) mit einer Stichproben-Quartilpräsenz von  $Q_{25\%}$ : 300,5 pmol/(ml\*h) und  $Q_{75\%}$ : 494,8 pmol/(ml\*h) wider. Der Median der sSMPD1-Aktivität der Kontrollgruppe stellte sich bei 118,4 pmol/(ml\*h) ein, ( $Q_{25\%}$ : 92,2 pmol/(ml\*h);  $Q_{75\%}$ : 148,7 pmol/(ml\*h)).



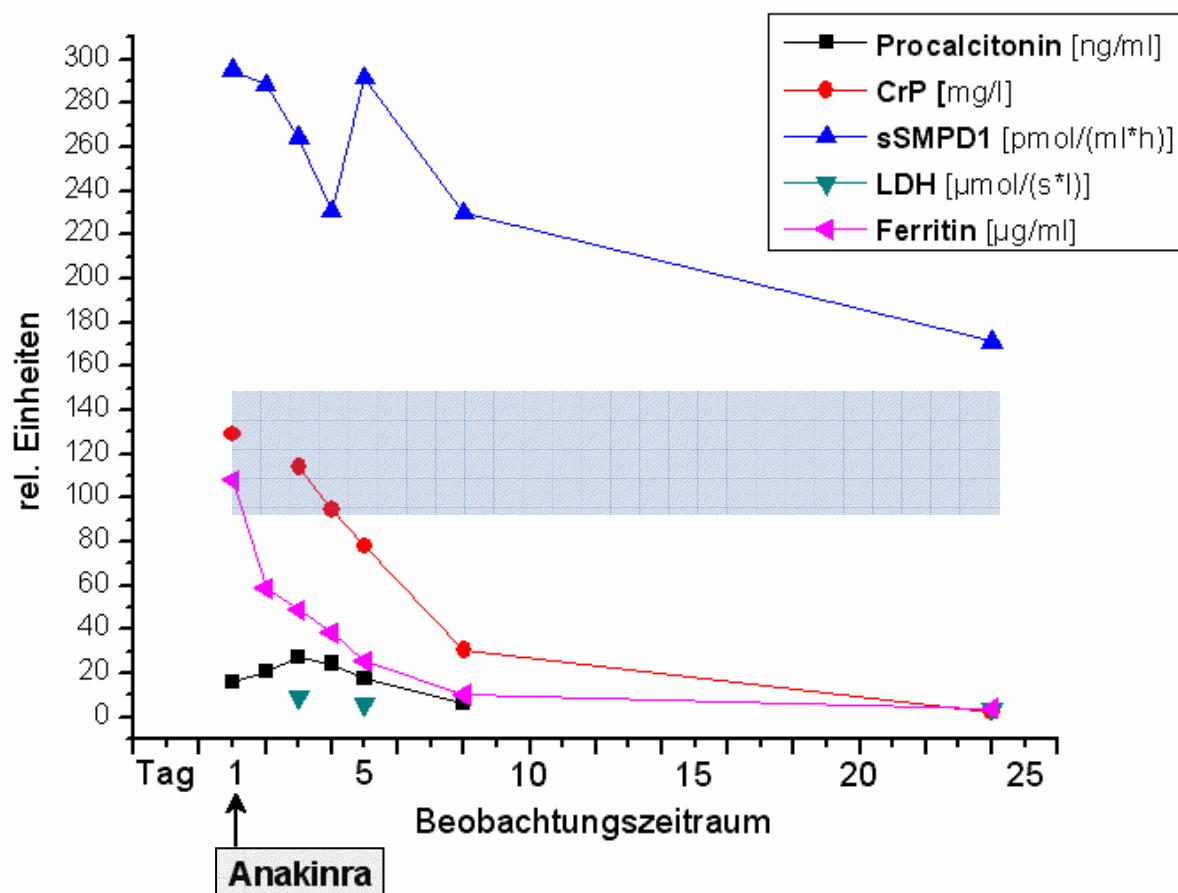
**Abb. 8: Vergleich der sSMPD1-Aktivitäten der Patientengruppe mit klinischer Diagnose: „schwere Sepsis“ versus Kontrollgruppe.** Die direkte sSMPD1-Aktivitätsbestimmung erfolgte nach Zugabe von C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin anhand densitometrischer Messung des entstandenen Hydrolyseprodukts C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid nach zweistündiger Inkubation. Deutlich erkennbar ist die signifikant höhere sSMPD1-Aktivität im Patientenserum gegenüber der sSMPD1-Aktivität im Kontrollserum ( $p < 0,01$ ). Analysiert wurden Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen mit je 12 Patienten/Probanden-Seren ( $3 \times n = 12$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test für unabhängige Stichproben.

#### **4.2.2. Einzelfallbeobachtung zum Makrophagenaktivierungssyndrom-**

##### **Die sSMPD1 im Kontext zu weiteren Entzündungsmarkern**

Die Verlaufsbeobachtung der Krankheitskasuistik eines schwerstkranken 13jährigen männlichen Patienten mit dem sepsisähnlichen Vollbild eines Makrophagenaktivierungssyndroms erfolgte neben intensivmedizinischer Intervention und klinischer Beurteilung über einen Zeitraum von 24 Tagen (25.09.06-18.10.06) zusätzlich durch Auswertung etablierter Inflammationsmarker, wie Procalcitonin (Brunkhorst, Eberhard et al. 1999), (Chawes, Rechnitzer et al. 2007), C-reaktives Protein (CrP) (Rey, Los Arcos et al. 2007), Laktatdehydrogenase (LDH) sowie Ferritin, welches als ein adäquater Verlaufsmarker für das MAS anerkannt ist (Cortis und Insalaco 2006), (Sreedharan, Bowyer et al. 2006). Neben intensivmedizinischen Maßnahmen beruhte die therapeutische Intervention in der Gabe hochdosierter Antibiotika sowie konventioneller Immunsuppressiva. Um die Folgen der weiterhin persistierenden Hyperzytokinämie abzumildern, wurde im beschriebenen Einzelfall der IL1 $\beta$ -Antagonist Anakinra (Kineret<sup>®</sup>) in das Therapieschema eingeschlossen und die intensive Verlaufsbeobachtung verschiedener Entzündungsparameter inklusive sSMPD1 initiiert. Der zu Beginn der laborchemischen Dokumentation und Anakinra-Intervention akut vital bedrohte Patient zeigte bei allen präsentierten Markern eine deutliche Erhöhung weit über den Normwert hinaus. Am Tag 1 wies das CrP als Akutphaseprotein mit 129,20 mg/l einen massiv erhöhten Serumwert auf (Normwert: < 8mg/l). Ebenso präsentierten sich Procalcitonin mit 16,20 ng/ml (Normwert: < 0,5ng/ml) sowie LDH mit 12,47  $\mu$ mol/(s\*l) (Normwert: 2-4 $\mu$ mol/(s\*l)) an Tag 1 enorm gesteigert. Die auffälligste Abweichung von physiologischen Parametern wurde jedoch beim gemessenen Ferritin sichtbar, welches am ersten Tag der laborchemischen Dokumentation mit einem Serumwert von 108253 ng/ml eine fast 800fache Erhöhung des altersentsprechenden Grenzwertes darstellt (7-142ng/ml). Einhergehend mit der Besserung des klinischen Krankheitsbildes aufgrund adäquaten Ansprechens des Therapieschemas zeigten die betrachteten Inflammationsmarker bis auf Procalcitonin eine stetige Werteabnahme an darauf folgenden Messzeitpunkten. Am Endzeitpunkt der Einzelfall-Studie (Tag 24), welcher sich durch Verlegung des klinisch stabilen Patienten auf Normalstation charakterisiert, lagen lediglich die Werte von CrP mit 2mg/l sowie LDH mit 3,91  $\mu$ mol/(s\*l) im Normbereich. Weiterhin weit außerhalb physiologischer Norm stellte sich Ferritin (3709ng/ml) dar, während für das bereits abgefallene Procalcitonin am Tag 24 aufgrund abgeklungener infektiöser Problematik auf die Wertebestimmung verzichtet wurde.

Im Kontext zum klinischen Zustand des Patienten sowie dem Verlauf gemessener Laborparameter wurde mittels zweifacher Serumbestimmung eine Charakterisierung der sSMPD1-Aktivität innerhalb des Beobachtungszeitraums durchgeführt. Die Serumaktivität verzeichnete an Tag 1 einen Wert von 295,1 pmol/(ml\*h), welcher verglichen mit adulten Patienten mit Sepsis einem Wert im unteren Bereich entspricht. Der Verlauf der sSMPD1-Aktivität zeigt bis auf ein lokales Maximum an Tag 5 einen stetigen Abfall um 41,9%. Die abschließende gemessene Sphingomyelinase-Aktivität von 171,4 pmol/(ml\*h) präsentiert sich leicht erhöht im Vergleich zum ermittelten sSMPD1-Median einer gesunden, jedoch nicht altersgematchten Kontrollgruppe.

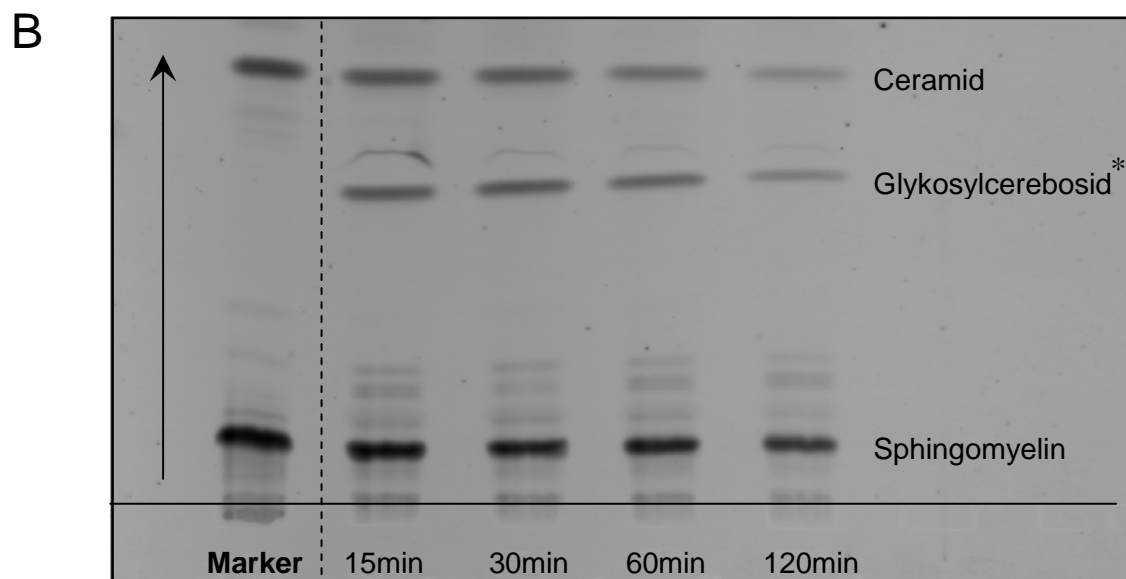
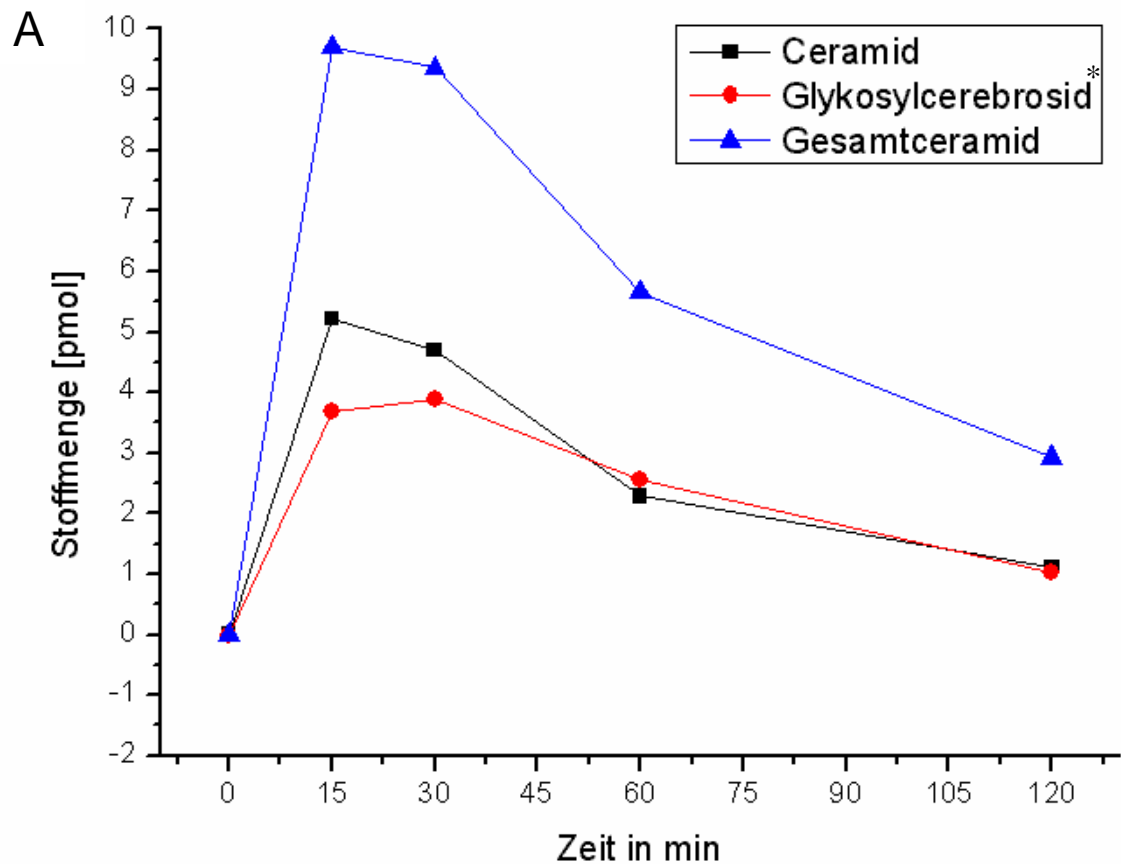


**Abb. 9: Verlauf der Laborwerte beschriebener Inflammationsmarker.** Innerhalb eines Zeitraums von 25 Tagen wurden die Serumwerte in unregelmäßigen Abständen bestimmt. Die in der Legende angegebenen Einheiten korrespondieren mit Zahlenangaben der Abszisse. Zur besseren Darstellung erfolgte anstatt der gebräuchlichen Einheitenbezeichnung für LDH (U/l) und Ferritin (ng/ml) eine alternative Größenzuordnung (siehe Legende). Zusätzlich zu den klinischen Inflammationsmarkern wurde der Verlauf der sSMPD1 ermittelt. Zum Vergleich dazu spiegelt der blaue Balken die sSMPD1-Aktivität ( $Q_{25\%}$ - $Q_{75\%}$ ) gesunder, adulter Kontrollprobanden wider. Erkennbar wird bei allen untersuchten Parametern ein Abfall der Werte mit zunehmender Zeit, welcher mit dem Heilungsprozess des Patienten, gestützt durch den Einsatz von Antibiotika sowie IL-1 $\beta$ -Antagonisten (Anakinra) korreliert.

### **4.3. Stimulationsexperimente am Endothelzellmodell**

#### **4.3.1. Zeitabhängige Dynamik SMPD1-induzierter Sphingomyelin-Hydrolyseprodukte**

Zur Gewinnung eines genaueren Einblicks in die Reaktionskinetik der sauren Sphingomyelinase am Endothelzellmodell sowie zur Verdeutlichung der zeitlichen Dynamik der am Sphingomyelinmetabolismus beteiligten Stoffwechselwege, wurde eine zeitabhängige Untersuchung der Reaktionsprodukte durchgeführt. Ermittelt wurde dabei der densitometrische Absolutwert der C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid-Banden sowie C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid-Banden nach Stimulation C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-markierter HMEC-1. Zu den Zeitpunkten: 15min, 30min, 60min und 120min erfolgte die Asservierung und Auswertung der Reaktionsprodukte (Abb. 10; drei unabhängige Experimente). Bereits nach 15min wurde ein globales Maximum der C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidgenerierung beobachtet, während die Produktion von C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid nach 30min ihren Höhepunkt erreichte. Demzufolge vollzog sich die Hydrolyse von C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin zu C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid bereits nach einigen Minuten, während die Weiterverstoffwechslung zu C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid mit einer geringfügigen, zeitlichen Verzögerung nachfolgte. Der annähernd kongruente zeitliche Verlauf der einzelnen C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidkonzentrationen endete nach einem durch uns festgelegten Zeitrahmen von 2h in einer deutlichen Abnahme der C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidfraktion (-68,3%) und C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosidfraktion (-59,4%).



**Abb. 10: (A) Zeitabhängige Konzentrationsabnahme der Produkte SMPD1-induzierter Sphingomyelinhydrolyse.** Nach metabolischem Endothelzell-Labeling mit C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin wurden die HMEC-1 mit Patientenserum stimuliert und deren Reaktionsprodukte zu verschiedenen Zeitpunkten asserviert sowie dünnschichtchromatographisch ausgewertet. Deutlich erkennbar ist ein Konzentrationsmaximum der Hydrolyseprodukte C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid sowie C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid. Mit zunehmender Messzeit wird ein stetiger Abfall der Konzentrationen erkennbar. Zusammenstellung der Mittelwerte aus 3 unabhängigen Stimulationsversuchen.

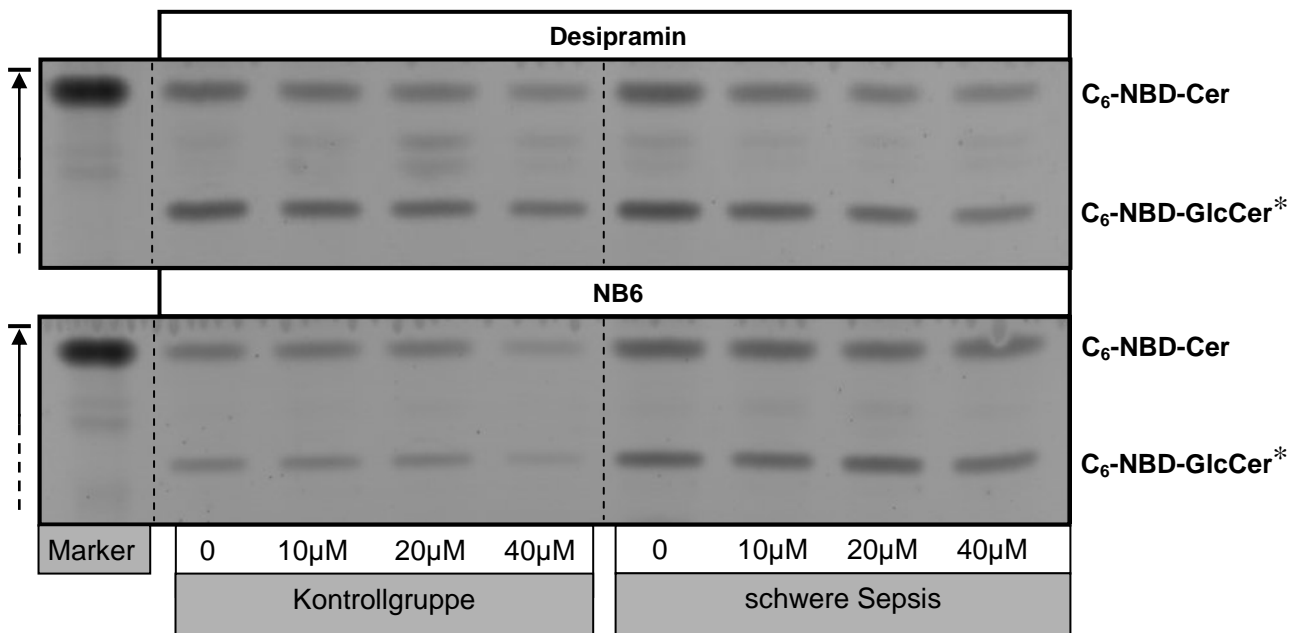
**(B) Repräsentative dünnschichtchromatographische Abbildung** einer Messung der in (A) dargestellten Werte.

#### **4.3.2. Inhibitorstudien der Endothelzellstimulationsversuche**

Zur genaueren Charakterisierung der Hemmbarkeit sphingolytischer sSMPD1-Aktivität erfolgte der Einsatz zwei unterschiedlicher Inhibitoren am humanen Endothelzellmodell. Die erste Versuchsserie erfolgte durch Stimulation C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-gelabellter HMEC-1 mit 12 Patientenseren (schwere Sepsis) sowie 12 Kontrollseren nach vorheriger Endothelzellinkubation mit dem trizyklischen Antidepressivum Desipramin, dessen hemmende Wirkung auf die hydrolytische Aktivität der SMPD1 in artifiziellen Sphingolipidmembranen bereits beobachtet werden konnte (Kolzer, Werth et al. 2004). Bei der zweiten Stimulationsserie wurde unter identischen Versuchsbedingungen die inhibitorische Wirkung des neuen, synthetischen Carbazol-Derivats NB6 getestet.

Da bei ermittelten Stichprobenwerten die Kolmogorov-Smirnov-Testung auf Normalverteilung nicht ausnahmslos bestätigt wurde, und eine Homogenität der Varianzen nicht durchgehend zutraf, wurde als geeignetes statistisches Modell für abhängige Stichproben der nichtparametrische Test nach Friedman (Friedman 1925), verifiziert durch den Wilcoxon Rangsummentest (Wilcoxon 1945), gewählt. Zur Vermeidung der durch multiples Testen entstehenden  $\alpha$ -Fehler-Kumulation innerhalb der Gruppen wurden die Ergebnisse mittels Bonferroni-Holm Prozedur überprüft (Bonferroni 1936, Holm 1979). Die statistische Betrachtung erfolgte nach densitometrischer Auswertung des direkten zellulären C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-Hydrolyseprodukts C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid und dessen Derivat C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid sowie der Summe beider Emissionen als Resultante der zellulären C<sub>6</sub>-NBD-Gesamtceramidproduktion. Anhand der Kalibriergeraden wurden die ermittelten Emissionsdaten der Stimationsversuche in die zugehörige Stoffmenge der fluoreszierenden Banden transformiert, um bei nachfolgenden graphischen Präsentationen (Abb. 11; Abb. 12) und tabellarischen Darstellungen (Tabelle 2; Tabelle 3) eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten. Eine veranschaulichende Visualisierung repräsentativer dünnschicht-chromatographischer Messergebnisse erfolgt in Abbildung 11.

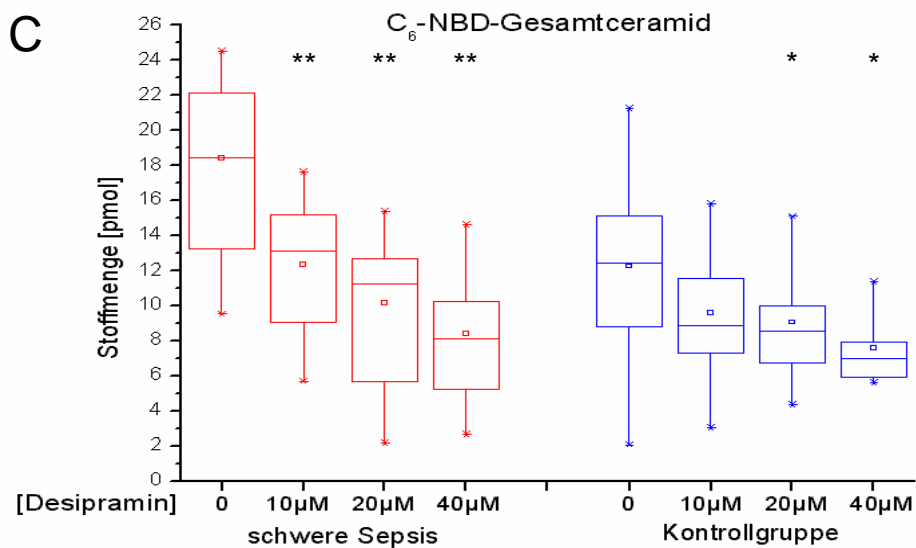
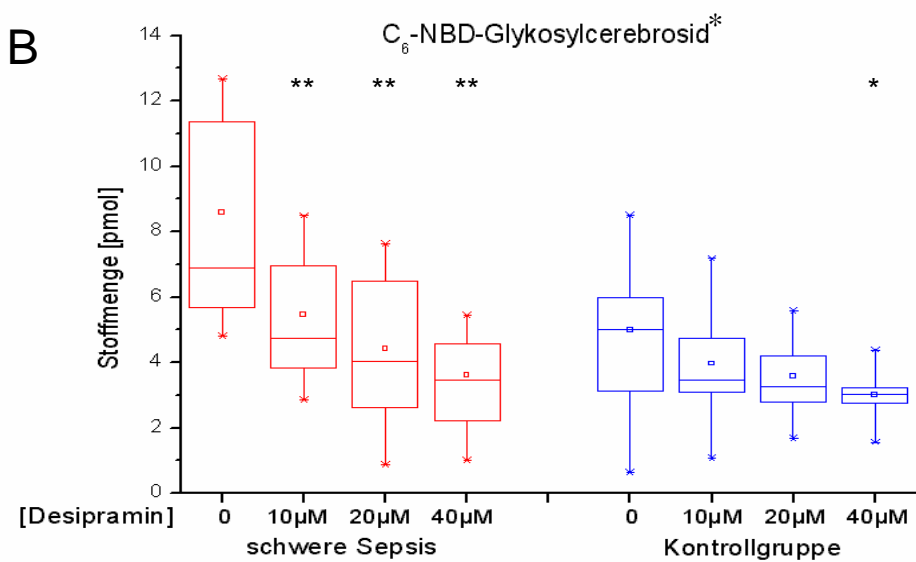
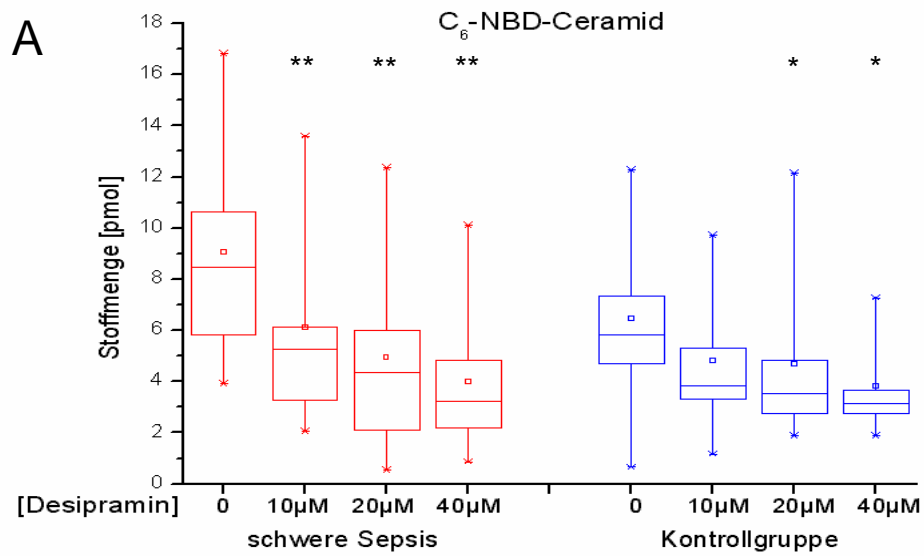




**Abb. 11: Dünnschichtchromatographische (DC) Sphingolipidmuster fluoreszenzmarkierter Endothelzellen nach Serumstimulation.** Konfluente HMEC-1-Monolayer wurden mit C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin metabolisch gelabelt und mit 5%igem Serum aus der Kontrollgruppe oder Patientengruppe (schwere Sepsis) für einen Zeitraum von 20min inkubiert. Vor Stimulationsbeginn wurden HMEC-1 für 30min mit den Inhibitoren Desipramin oder NB6 vorbehandelt. Neben deutlichen Intensitätsunterschieden zwischen den Messwerten der Kontrollgruppe < Patientengruppe (schwere Sepsis) ist innerhalb der Kontrollgruppe/Patientengruppe ein zunehmender Intensitätsabfall bei steigender Inhibitorikonzentration erkennbar. Präsentiert ist das Ende der Lauffront der DC-Kieselgelplatten mit den erkennbaren C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid-Banden (C<sub>6</sub>-NBD-Cer; rf: 0,8; Marker zugeordnet) sowie C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid-Banden C<sub>6</sub>-NBD-GlcCer; rf: 0,6). Die Laufrichtung ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Die densitometrische Analyse diente als Grundlage der Datenerhebung der in Abb.12 und Abb.13 dargestellten Grafiken. Repräsentative Ausschnitte aus 24 DC-Aufnahmen.

### Versuchsserie 1:

Bei der ersten Versuchsserie erfolgte die Serumstimulation konfluenter C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-HMEC-1 nach vorheriger, 30minütiger Inkubation mit Desipramin. Untersucht wurden konzentrationsabhängige inhibitorische Effekte des endothelialen Sphingolipidmetabolismus unter physiologischen beziehungsweise proinflammatorischen Bedingungen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 graphisch aufgeführt sowie in Tabelle 2 aufgelistet.



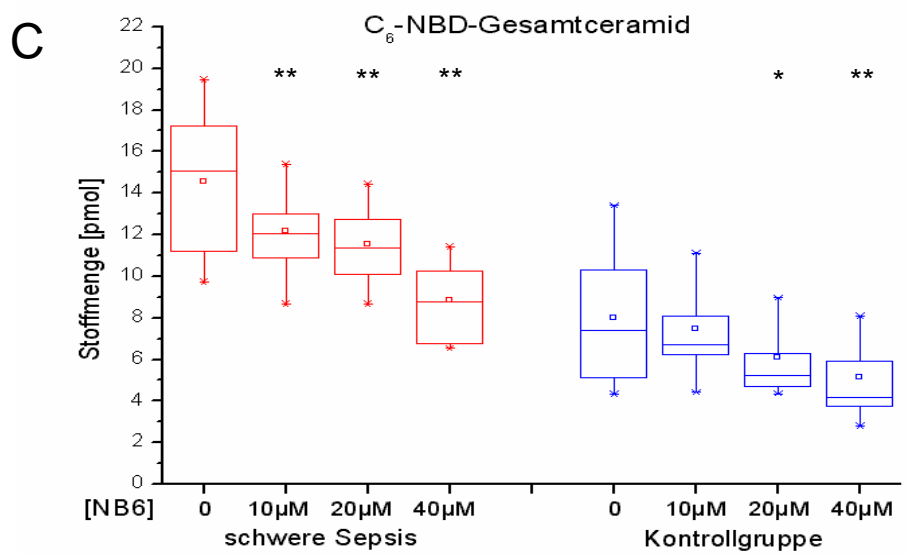
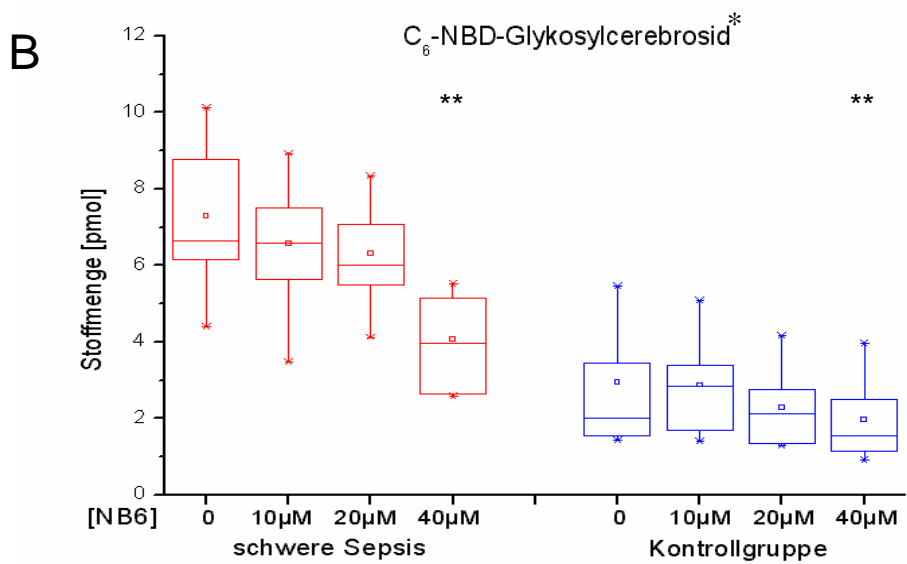
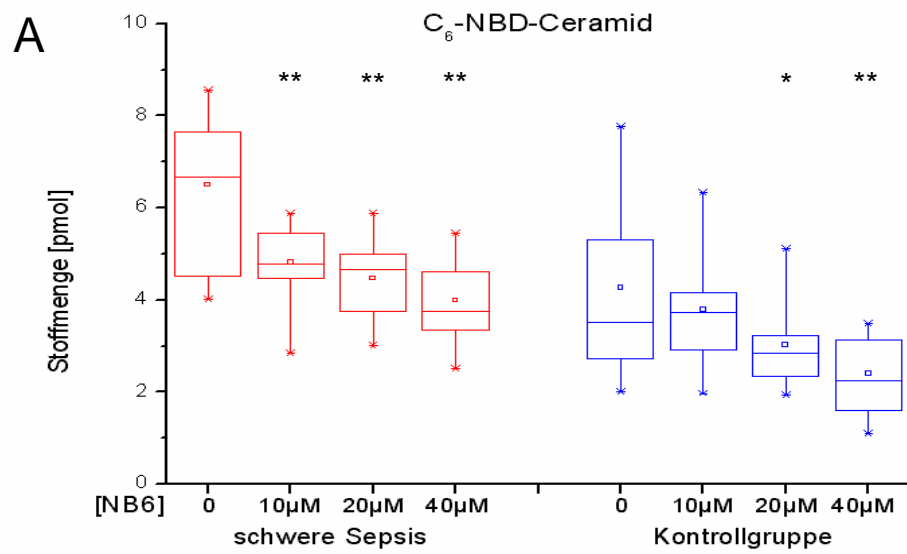
**Abb. 12: Inhibitorische Wirkung von Desipramin auf SMPD-1-induzierte C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidgenerierung (A), die damit verbundene C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosidproduktion (B) und den aus (A) und (B) addierten C<sub>6</sub>-NBD-Gesamtceramidumsatz (C).** Konfluente, mit C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin metabolisch gelabelte HMEC-1 wurden nach 30 minütiger Desipramin-Inkubation mit Patientenserum (schwere Sepsis, n=12) oder Serum gesunder Probanden (n=12) über einen Zeitraum von 20min stimuliert, anschließend durch Lipidextraktion aufbereitet und dünnschichtchromatographisch analysiert. Mit ansteigender InhibitorKonzentration wird die zunehmende Reduktion des Stoffmengenumsatzes einzelner Fraktionen innerhalb der Patienten/Kontrollgruppe deutlich erkennbar. Signifikante Unterschiede gegenüber der nichtinhibierten Stichprobe wurden mit \* für p<0,05 sowie \*\* für p<0,02 dargestellt (Statistische Auswertung: Friedmann-Wilcoxon Test mit Bonferroni-Holm Korrektur).

		Desipramin					
Fraktion	Gruppe	0	10µM	20µM	40µM	IC <sub>50</sub>	r <sup>2</sup>
C <sub>6</sub> -NBD-Ceramid	schwere Sepsis	7,14 (100%)	4,81 (67,4%)	4,67 (65,4%)	3,79 (53,1%)	38,5µM	0,76
	gesunde Kontrollen	3,98 (100%)	3,74 (93,8%)	2,85 (71,6%)	2,32 (58,2%)	45,6µM	0,94
C <sub>6</sub> -NBD-Glykosylcerebrosid	schwere Sepsis	6,90 (100%)	6,66 (96,6%)	6,12 (88,8%)	4,23 (61,3%)	54,3µM	0,94
	gesunde Kontrollen	2,55 (100%)	2,92 (114,6%)	2,19 (85,6%)	1,67 (65,7%)	57,0µM	0,74
C <sub>6</sub> -NBD-Gesamtceramid	schwere Sepsis	15,05 (100%)	12,22 (81,2%)	11,38 (75,6%)	9,05 (60,1%)	---	---
	gesunde Kontrollen	8,02 (100%)	6,78 (84,5%)	5,62 (70,1%)	4,73 (58,9%)	---	---

**Tab. 2: Desipramin-induzierte Effekte auf endothelialen Sphingolipidmetabolismus.** Die detektierte, abfallende Stoffmenge von C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid und C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid steht im inversen Zusammenhang zur steigenden Konzentration des verwendeten Inhibitors. Den Desipramin-Konzentrationen (0-40µM) sind die Stoffmengen-Mediane (pmol) der Gruppenstichproben gegenübergestellt. In Klammern sind die prozentualen Veränderungen der Gruppen gegenüber der inhibitorfreien Versuchsanordnung (=100%) aufgeführt. Im verwendeten *in vitro*-Modell wurde anhand linearer Regressionen eine indirekte Ermittlung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>) von Desipramin auf die hydrolytische SMPD1-Wirkung durchgeführt, der Korrelationskoeffizient (r<sup>2</sup>) ist angegeben.

## Versuchsserie 2:

Nach 30minütiger Inkubation konfluent gewachsener C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-HMEC-1 erfolgte im simultanen Ablauf zur Versuchsserie 1 die endotheliale Serumstimulation mit dem zu untersuchenden Carbazol-Derivat NB6. Um vergleichbare Aussagen zwischen den Ergebnissen der Versuchsserien zu formulieren, wurden in beiden Serien identische Serumproben des Patienten- beziehungsweise Kontrollkollektivs eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 sowie in Tabelle 3 präsentiert.



**Abb. 13: NB6-induzierte Hemmung hydrolytischer SMPD1-Wirkung auf C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidumsatz (A), die damit korrelierende C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosidproduktion (B) sowie den aus (A) und (B) addierten C<sub>6</sub>-NBD-Gesamtceramidumsatz (C).** Nach 30minütiger NB6 Präinkubation erfolgte die 20minütige Serumstimulation (Patientenserum (n=12), Kontrollserum (n=12)) konfluent gewachsener C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-HMEC-1. Nach Stimulation wurden die gewonnenen Proben mittels Lipidextraktion verarbeitet und dünnschichtchromatographisch ausgewertet. Mit ansteigender NB6-Konzentration ist eine Verminderung des Stoffmengenumsatzes innerhalb einzelner Fraktionen sichtbar. Signifikante Unterschiede gegenüber der nicht inhibierten Stichprobe wurden mit \* für p<0,05 sowie \*\* für p<0,02 dargestellt. (Statistische Auswertung: Friedmann-Wilcoxon Test mit Bonferroni-Holm Korrektur).

Fraktion	Gruppe	NB6					
		0	10µM	20µM	40µM	IC <sub>50</sub>	r <sup>2</sup>
C <sub>6</sub> -NBD-Ceramid	schwere Sepsis	8,73 (100%)	5,34 (61,2%)	4,60 (52,7%)	3,23 (37,1%)	26,2µM	0,92
	gesunde Kontrollen	5,89 (100%)	4,34 (73,7%)	3,72 (63,1%)	3,19 (54,2%)	39,0µM	0,83
C <sub>6</sub> -NBD-Glykosylcerebrosid	schwere Sepsis	8,10 (100%)	4,89 (60,4%)	4,17 (51,4%)	3,59 (44,3%)	28,9µM	0,72
	gesunde Kontrollen	5,33 (100%)	3,61 (67,7%)	3,27 (61,4%)	3,07 (57,6%)	40,9µM	0,67
C <sub>6</sub> -NBD-Gesamtceramid	schwere Sepsis	19,47 (100%)	13,18 (67,7%)	11,52 (59,2%)	8,50 (43,6%)	---	---
	gesunde Kontrollen	12,58 (100%)	9,44 (75,0%)	8,65 (68,7%)	7,03 (55,9%)	---	---

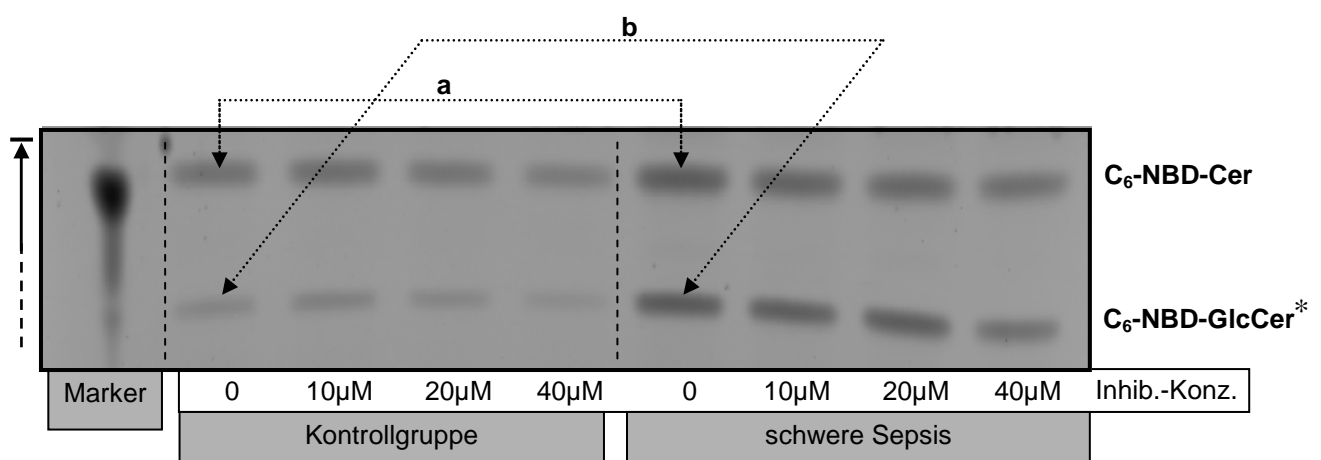
**Tab. 3: Veränderungen des endothelialen Sphingolipidmetabolismus nach NB6 Inkubation.** Mit zunehmender Inhibitorkonzentration sind abfallende Stoffmengen innerhalb der C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid-, der C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid- sowie der daraus resultierenden C<sub>6</sub>-NBD-Gesamtceramidfraktion erkennbar. Den NB6-Konzentrationen (0-40µM) sind die Stoffmengen-Mediane (pmol) der Gruppenstichproben gegenübergestellt. Prozentualen Veränderungen der Gruppen gegenüber der inhibitorfreien Versuchsanordnung (=100%) sind in Klammern aufgeführt. Anhand linearer Regressionen wurde im verwendeten *in vitro*-Modell eine indirekte Ermittlung der IC<sub>50</sub> von NB6 auf die hydrolytische SMPD1-Wirkung durchgeführt, das Bestimmtheitsmaß (r<sup>2</sup>) ist angegeben.

#### 4.3.3. Serumcharakterisierung am Modell C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin

##### -markierter Endothelzellen

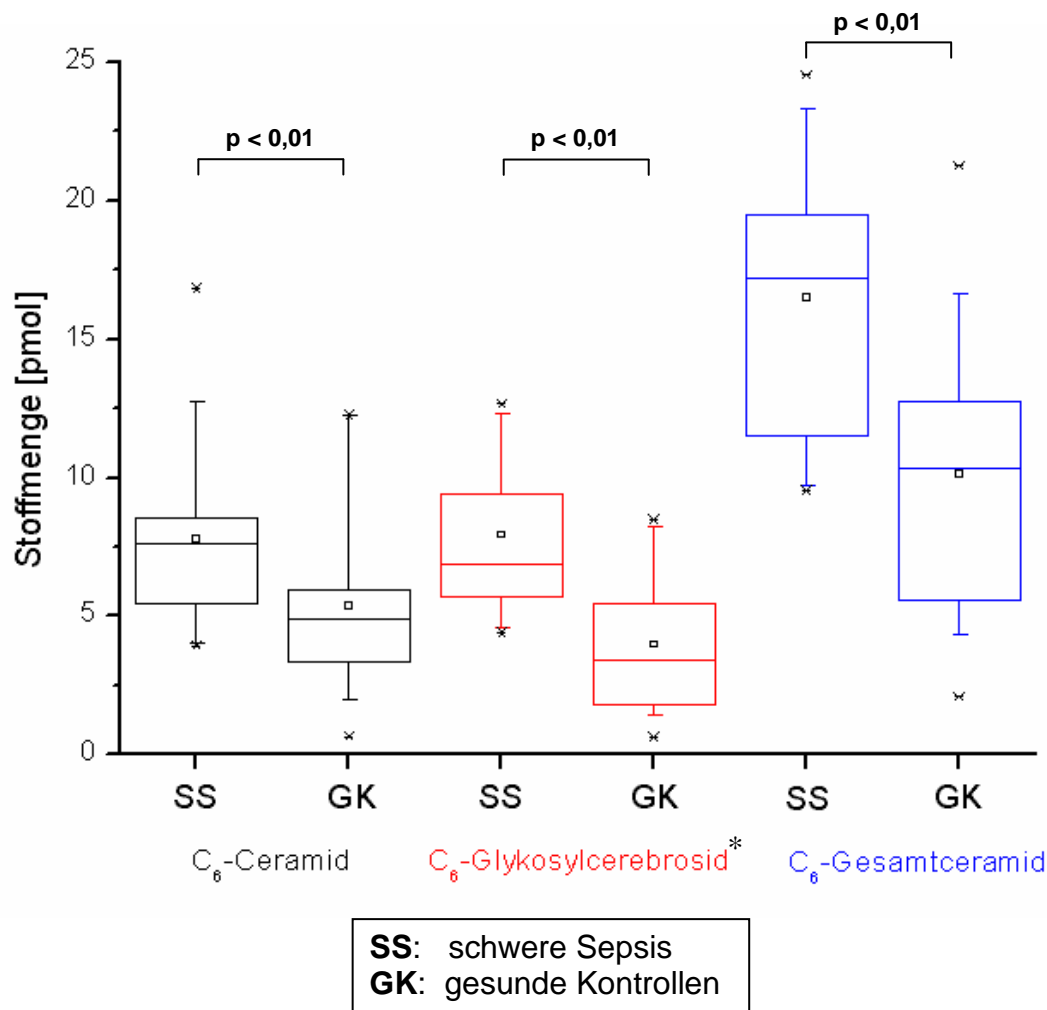
Neben einer Betrachtung der Effekte eingesetzter Inhibitoren am *in vitro* HMEC-1 Modell (3.4.5.) erlaubte die Versuchsanordnung ferner eine Gegenüberstellung der generellen Wirkung der Patienten- beziehungsweise Kontrollseren auf die SMPD1-induzierte C<sub>6</sub>-NBD-

Sphingomyelinhydrolyse der Endothelzellen (Abb. 14). Hierbei wurden die Messergebnisse der ungehemmten Stichproben der C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelinprodukte untereinander verglichen (Abb. 15). Eine signifikante Abnahme ( $p<0,01$ ) der C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidstoffmenge der Kontrollgruppe (Median: 5,1 pmol; Q<sub>25%</sub>: 3,3 pmol; Q<sub>75%</sub>: 6,0 pmol) gegenüber der C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidstoffmenge der Patientengruppe (Median: 7,6 pmol; Q<sub>25%</sub>: 5,4 pmol; Q<sub>75%</sub>: 8,6 pmol) konnte statistisch mittels t-Test für unabhängige Stichproben gesichert werden. Der Abfall der Stoffmenge der C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosidwerte der Kontrollgruppe (Median: 3,5 pmol; Q<sub>25%</sub>: 1,8 pmol; Q<sub>75%</sub>: 5,5 pmol) im Vergleich zu den Werten der Patientengruppe (Median: 7,0 pmol; Q<sub>25%</sub>: 5,7 pmol; Q<sub>75%</sub>: 9,4 pmol) erwies sich durch verwendeten t-Test ebenfalls als hochsignifikant ( $p<0,01$ ). Dementsprechend traten in der Analyse der aus C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidstoffmenge und C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosidstoffmenge kumulierten C<sub>6</sub>-NBD-Gesamtceramidstoffmenge gleichfalls signifikante Unterschiede auf ( $p<0,01$ ). Die Patientenmesswerte (Median: 17,2 pmol; Q<sub>25%</sub>: 11,5 pmol; Q<sub>75%</sub>: 19,5 pmol) präsentierten sich hierbei deutlich erhöht im Vergleich zu den Ergebnissen der Kontrollgruppe (Median: 10,4 pmol; Q<sub>25%</sub>: 5,6 pmol; Q<sub>75%</sub>: 12,5 pmol).



**Abb. 14: Endotheliale C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-Hydrolyseprodukte nach Serumstimulation.**

Konfluente, mit C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin metabolisch markierte HMEC-1 wurden mit den Inhibitoren Desipramin oder NB6 für 30min inkubiert sowie anschließend mit 5%igem Serum der Kontroll- oder Patientengruppe 20min stimuliert. Gegenstand der densitometrischen Analyse war in diesem Fall die alleinige Serumwirkung (Inhibitorkonzentration=0) auf den endothelialen C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelinmetabolismus. **(a)** Der Vergleich innerhalb der inhibitorfreien Banden stellt eine stärkere Intensität der gebildeten C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid-Stoffmengen bei der Patientengruppe (schwere Sepsis) gegenüber der Stoffmengen der Kontrollgruppe dar. **(b)** Noch deutlicher präsentieren sich in vorliegender Abbildung die Unterschiede zwischen den ungehemmten C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosidstoffmengen der Patienten- und Kontrollgruppe. Präsentiert ist das Ende der Lauffront der DC-Kieselgelplatten, die Laufrichtung ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Repräsentative Darstellung aus 24 dünnschichtchromatographischen Aufnahmen.



**Abb. 15: Vergleich endothelialer  $C_6$ -NBD-Ceramidfraktionen nach Serumstimulation.**

20 minütige Stimulation konfluenter  $C_6$ -NBD-Sphingomyelin-HMEC-1 mit 5%igem Serum der (GK) Kontrollgruppe (GK; n=12) oder Patientengruppe (SS; n=12). Der Stoffmengenvergleich innerhalb der  $C_6$ -NBD-Ceramidfraktion stellt signifikant erhöhte Stoffmengenmesswerte nach  $C_6$ -NBD-HMEC-1-Stimulation mit Patientenserum dar ( $p < 0,01$ ), ebenso liegen bei Betrachtung der  $C_6$ -Glykosylcerebrosidfraktion die Patientenwerte deutlich höher als die korrespondierenden Kontrollergebnisse ( $p < 0,01$ ). Innerhalb der  $C_6$ -Gesamtceramidfraktion weisen dementsprechend mit Patientenserum stimulierte Endothelzellen gegenüber den Kontrollserum-Werten signifikant stärkere Stoffmengen auf ( $p < 0,01$ ). Die *boxplots* präsentieren aufgrund Doppelbestimmung jeweils ein Kollektiv aus 24 unabhängigen Messwerten. Statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test für unabhängige Stichproben.

#### 4.4. Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung des Endothelzellverbands nach proinflammatorischer Stimulation

##### 4.4.1. Qualitative Detektion dynamischer Prozesse innerhalb der Endothelzellmembran

Die bisher ermittelten Daten beschreiben die SMPD1-Umsatzrate im Serum sowie dessen Reaktionsdynamik am Modell metabolisch gelabelter  $C_6$ -NBD-HMEC-1 genauer. Im

Folgenden werden die bereits gewonnenen Daten durch fluoreszenzmikroskopische HMEC-1-Untersuchungen auf biochemischer Ebene visualisiert und somit im qualitativen Kontext erweitert. Zur mikroskopischen Probenanfertigung erfolgte die Inkubation subkonfluent gewachsener HMEC-1 mit 5%igem Serum der Kontroll- oder Patientengruppe. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse zur zeitabhängigen Dynamik der SMPD1-Aktivität wurde die Stimulationsdauer der vorbereiteten HMEC-1 auf 20min festgelegt, da innerhalb dieses Zeitraums maximale C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidkonzentrationen gemessen wurden. Die visuelle Auswertung fluoreszenzmarkierter Präparate erfolgte durch konfokalmikroskopische Betrachtung des mit Patientenserum (schwere Sepsis) stimulierten HMEC-1-Monolayers im Vergleich zu dem mit Kontrollserum behandelten Endothelzell-Monolayer. In zwei Fluoreszenzkanälen wurden die eingesetzten Sekundärantikörper auf identischer Scanebene visualisiert (*pinhole*=1,0 *Airy unit*) sowie in einer zusätzlichen *overlay*-Darstellung kombiniert wiedergegeben (Abb. 16). Dabei detektierte der erste Kanal bestmöglich die grünen Fluoreszenzen (FITC, Alexa 488<sup>®</sup>) (Bandpass-Filter 505nm-530nm). Unter Verwendung eines Longpass-Filters (650nm) wurde die im zweiten Kanal eingesetzte Scansensibilität adäquat auf den rot markierten Ceramid-Sekundärantikörper (Cy5) abgestimmt. In drei unabhängigen Versuchsserien erfolgte die kombinierte Antikörpermarkierung (Doppelfärbung) sowie konfokalmikroskopische Darstellung folgender Endothelzellepitope: CD95 + Ceramid (Abb. 16; A), Gangliosid GM<sub>1</sub> + Ceramid (Abb. 16; B) sowie SMPD1 + Ceramid (Abb. 16; C). Nach Beendigung des 20minütigen Stimulationszeitraums wurden deutliche biochemische HMEC-1-Veränderungen mittels des Konfokalmikroskops LSM510 meta<sup>®</sup> detektiert, welche im beigefügten Abbildungstext näher erläutert werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die fluoreszenzmikroskopische Gegenüberstellung von HMEC-1 der Patientenserum-Gruppe und Kontrollserum-Gruppe in allen Färbungsreihen erkennbare Unterschiede bezüglich Intensität und Reaktionsmuster der eingesetzten Antikörper aufweist. Diese quantitative Differenz wird vordergründig bei densitometrischer Auswertung membranassoziierter Ceramidepitope (roter Kanal) sichtbar. Hierbei imponieren die mit Patientenserum stimulierten HMEC-1 durch eine deutlich gesteigerte Ceramidgenerierung. Neben quantitativen Intensitätsunterschieden fallen beim Vergleich der differenziert stimulierten HMEC-1 zusätzlich strukturelle Konformitätsänderungen auf, die ebenfalls in allen Fluoreszenzkanälen sichtbar sind. Dementsprechend zeichnen sich proinflammatorisch stimulierte HMEC-1 (Patientenserum) durch Bildung eines spezifischen Membran-Verteilungsmusters aus, welches sich bei Kontrollserum-HMEC-1 nicht nachweisen lässt.

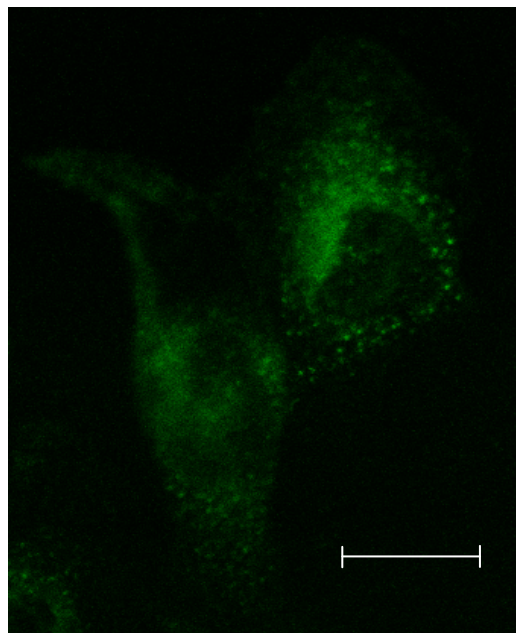
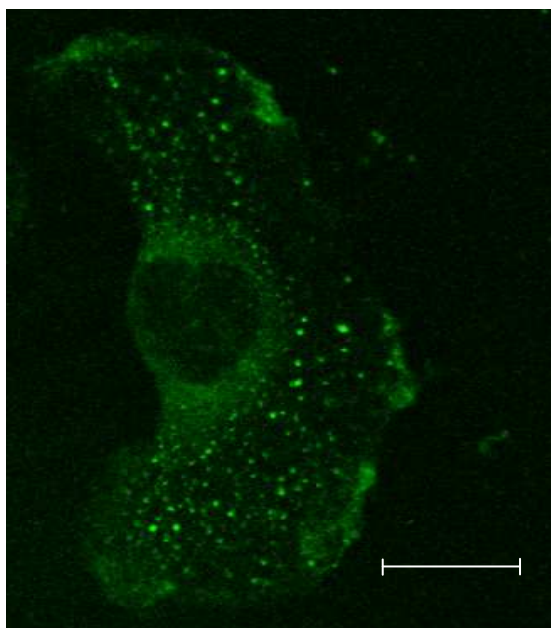


**A**

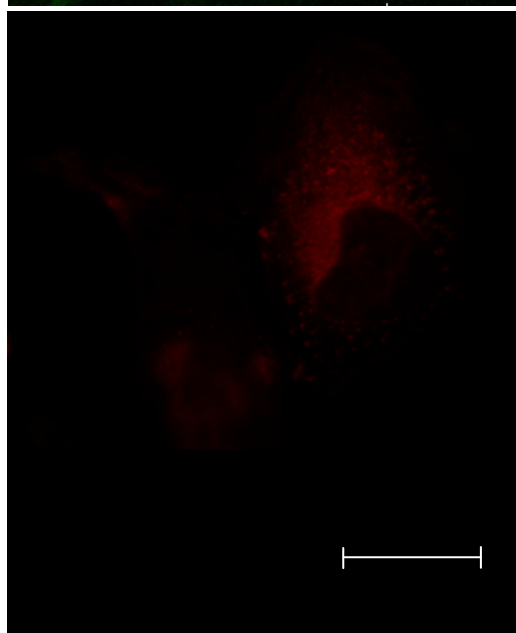
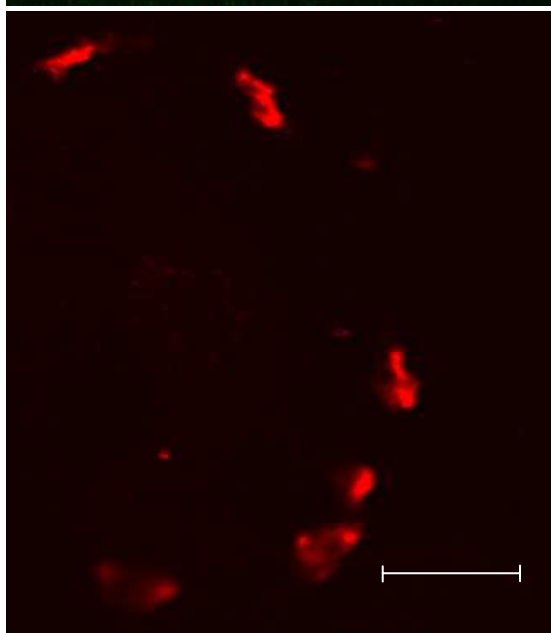
**Patientenserum (schwere Sepsis)**

**Kontrollserum**

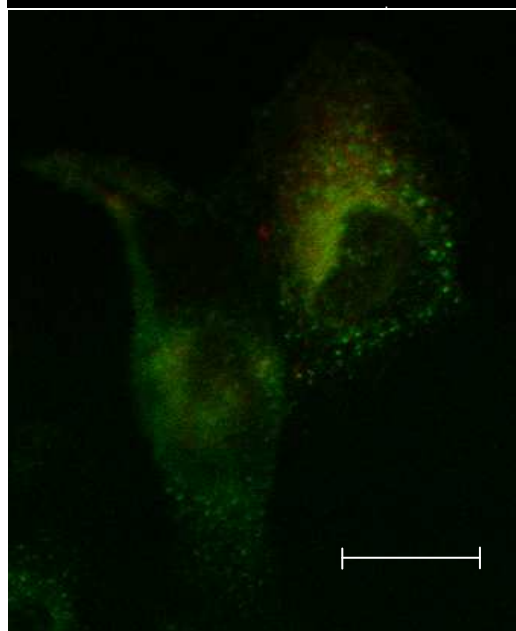
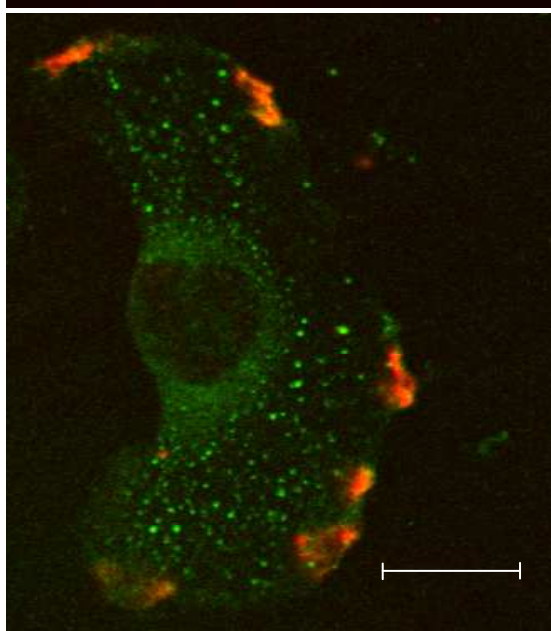
**Anti-CD 95  
(FITC)**

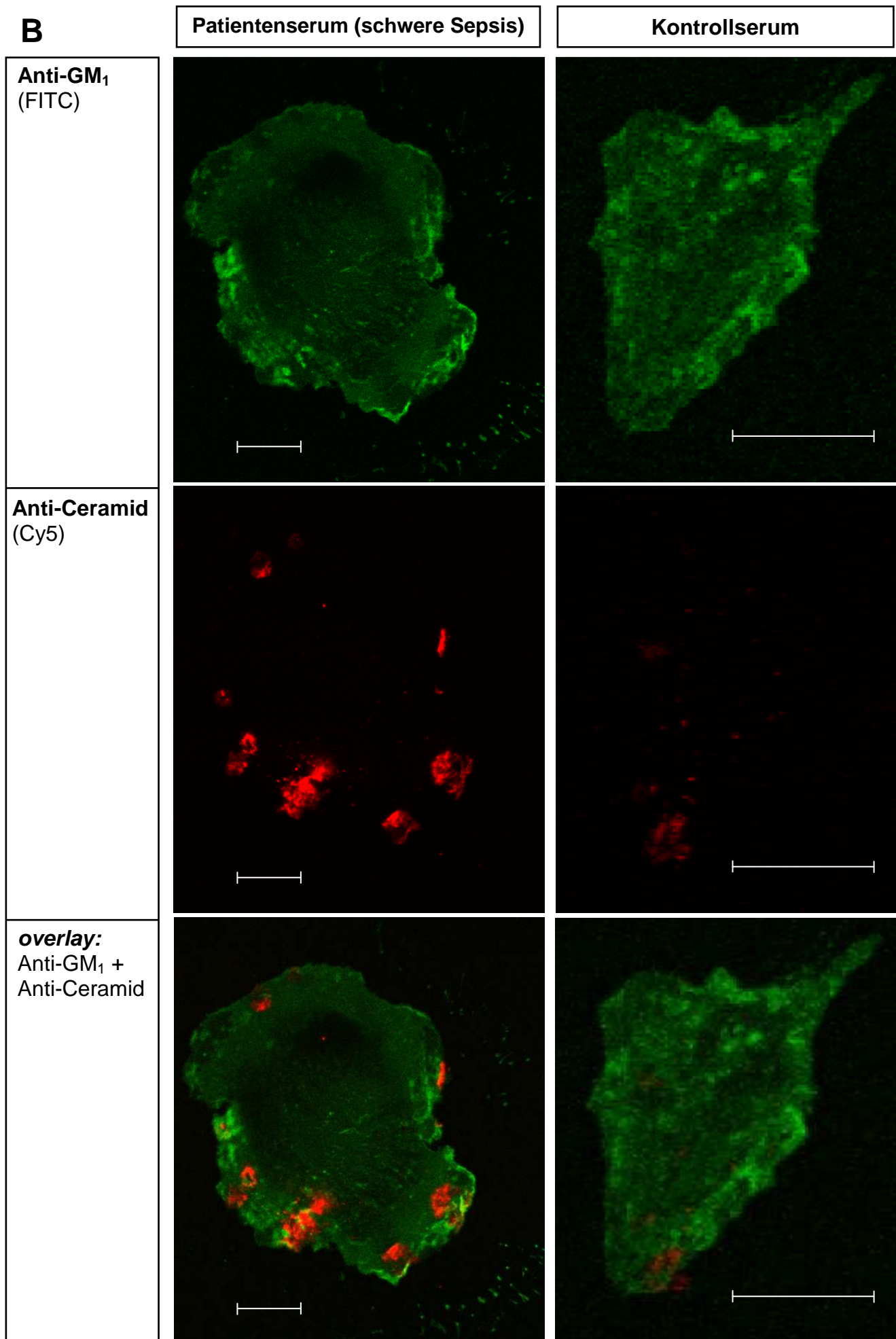


**Anti-Ceramid  
(Cy5)**



**overlay:  
Anti-CD95 +  
Anti-Ceramid**



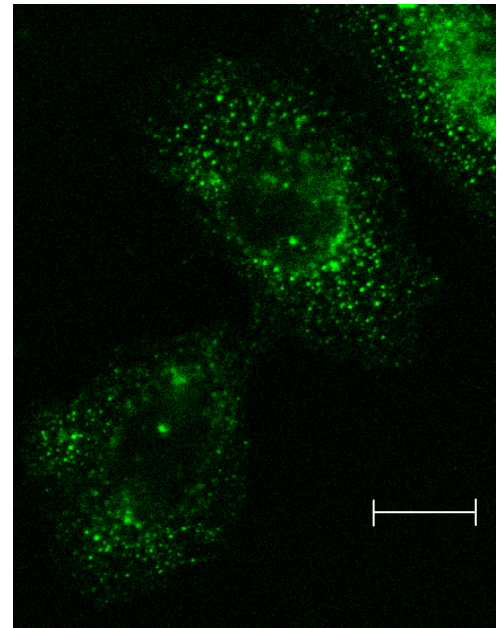
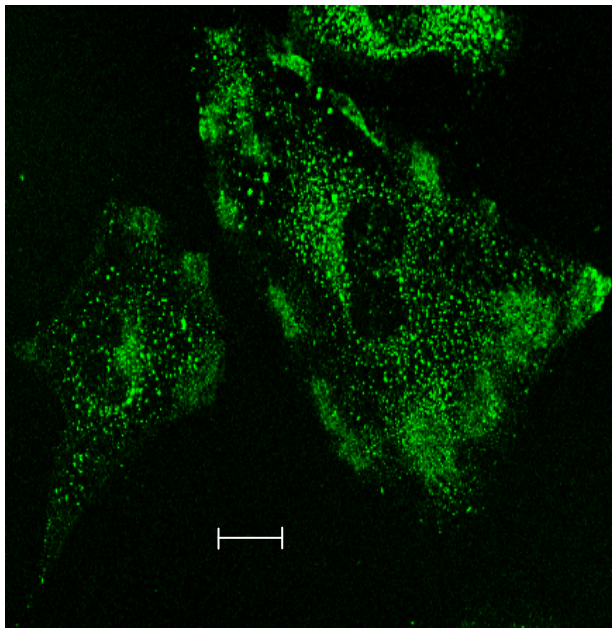


**C**

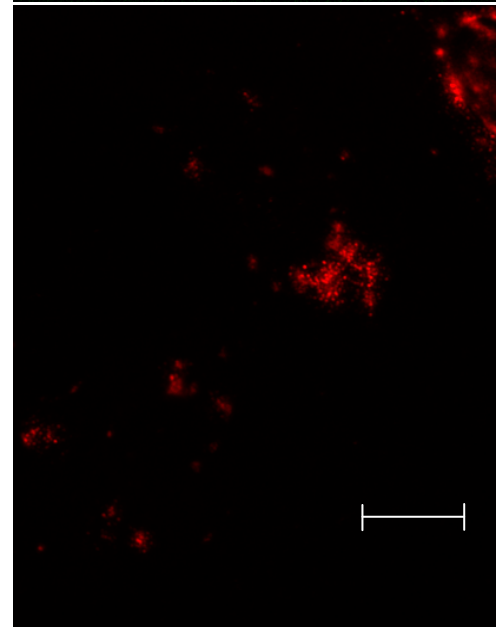
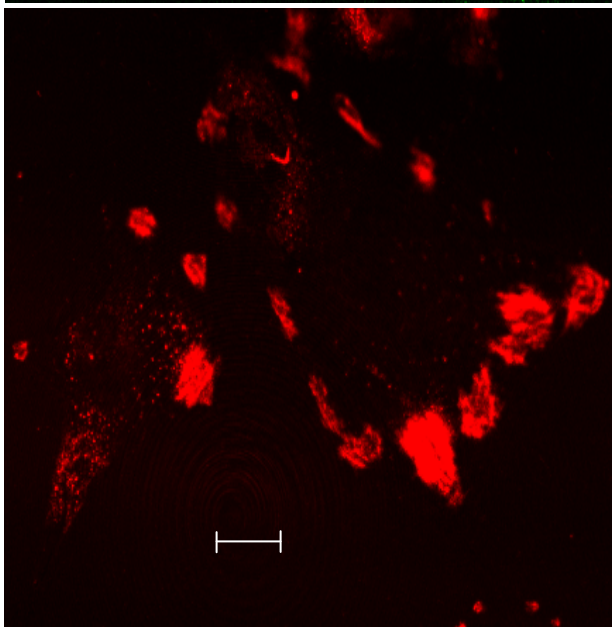
**Patientenserum (schwere Sepsis)**

**Kontrollserum**

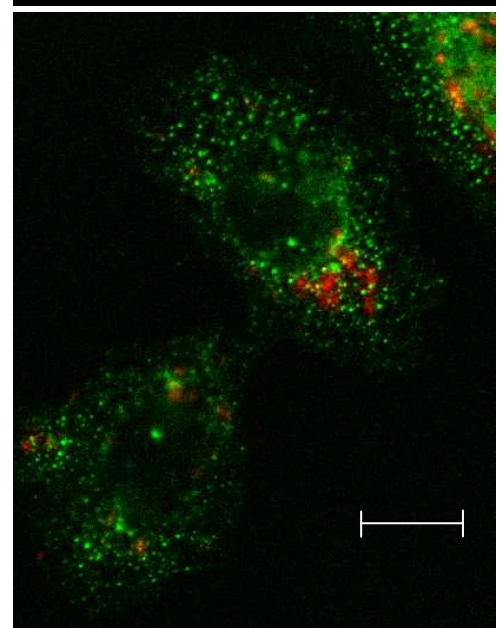
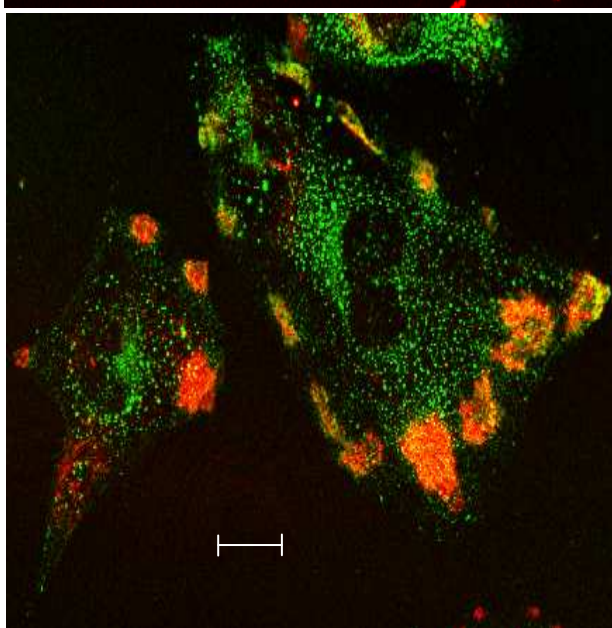
**Anti-SMPD1**  
(Alexa 488®)



**Anti-Ceramid**  
(Cy5)



**overlay:**  
Anti-SMPD1+  
Anti-Ceramid





**Abb. 16: Endotheliale Zellmembranstrukturen nach proinflammatorischer Stimulation.** Auf Deckglas subkonfluent gewachsener HMEC-1-Monolayer wurde 20 min mit 5%igem Serum der Patienten oder Kontrollgruppe stimuliert und anschließend mit 5% Paraformaldehyd fixiert. Zur Blockierung unspezifischer Zellmembranbindungen erfolgte vor dem kombinierten Primärantikörper-*staining* die Inkubation der Zellen mit 1% BSA (in HBSS) für 10min. Nach Abschluß des Sekundärantikörper-*stainings* erfolgte die Präparateauswertung mittels Laser Scanning Mikroskop LSM510 meta<sup>®</sup> unter Verwendung passender Fluoreszenzfilter und vergleichbarer Scaneinstellungen (*pinhole*=1,0 *Airy unit* → identische Scanebene; *detector gain*=1,0). Da die fixierten Endothelzellen nicht mit dem Membranporen-Bildner Saponin behandelt wurden, ist die Zellmembran-Passierbarkeit der fluoreszierenden Antikörper weitestgehend ausschließbar und eine darauf basierende spezifische intrazelluläre Fluoreszenzmarkierung unwahrscheinlich.

**(A) Clustering membranständigen Ceramids und CD95 nach proinflammatorischer Stimulation.** Mit Patientenserum (schwere Sepsis) stimulierte HMEC-1 zeigen gegenüber den mit Kontrollserum behandelten Zellen eine deutliche Umverteilung der im grünen Kanal (FITC) detektierten CD95-Antikörper, welche sich in randständigen membranassoziierten Mikrodomänen anreichern. Ebenfalls lässt sich bei HMEC-1, die mit Patientenserum stimuliert wurden, eine verstärkte Ceramidgenerierung und Bildung membranständiger *rafts* im roten Kanal detektieren. Im *overlay*-Bild wird bei den Endothelzellen der Patientenserum-Gruppe die räumliche Kolo-kalisation der Ceramid-*rafts* und CD95-Domänen durch Fluoreszenzüberlagerung (orange) sichtbar. Im Gegensatz dazu tritt bei HMEC-1 der Kontrollserum-Gruppe keine räumliche Übereinstimmung der beiden angefärbten Zellmembranepitope auf (fehlende Farbaddition). 400fache Vergrößerung. Abstandsbalken entspricht 20µm. Repräsentative Abbildungen aus 18 unabhängigen Experimenten.

**(B) Bildung von Gangliosid GM<sub>1</sub> Lipid-rafts in räumlicher Nähe zu Ceramid-Membrandomänen nach proinflammatorischer Serumstimulation.** Im grünen Kanal präsentieren mit Patientenserum stimulierte HMEC-1, welche mit FITC-konjugiertem Cholera-Toxin B Primärantikörper gefärbt wurden, ein konzentriertes Auftreten von GM<sub>1</sub>-Epitopen in randständigen Zellmembranarealen. Weiterhin werden vesikuläre Membranabschnürungen der proapoptotisch stimulierten Endothelzelle erkennbar. Im Vergleich dazu verbleibt bei den HMEC-1 der Kontrollgruppe zwar ein fast vergleichbares GM<sub>1</sub>-Membranmuster, jedoch wird bei der weiteren Auswertung der Ceramid-Antikörper im roten Kanal eine nur sehr schwache Ceramidgenerierung feststellbar. Demgegenüber lässt sich bei den mit Patientenserum stimulierten Zellen die heterogene Assemblierung zu intensiven Ceramid-Membrandomänen (max. 20µm) deutlich beobachten. Im *overlay*-Bild kommt es bei den Zellen beider Gruppen nicht zu einer Kolo-kalisation der angefärbten Epitope (fehlende Farbaddition). Jedoch fällt bei den Patientenserum-HMEC-1 eine klar strukturierte, räumliche Separation beider Lipidspezies (Cer; GM<sub>1</sub>) im Zellmembranverband auf. Dies impliziert, dass die angefärbten membranständigen HMEC-1-Epitope eigene Domänen bilden und klar abgegrenzt nebeneinander coexistieren. Abstandsbalken entspricht 20µm. Repräsentative Abbildungen aus 12 unabhängigen Experimenten.

**(C) Proinflammatorische Steigerung extrazellulärer SMPD1-Aktivität und damit assoziierter Ceramidgenerierung.** Die im grünen Kanal visualisierten SMPD1-Antikörper deuten bei beiden HMEC-1-Gruppen (Patientenserum, Kontrollserum) zellinterne Strukturen in vergleichbarer Intensität an (Alexa 488<sup>®</sup>-Fluorophor-Internalisierung). Zusätzlich imponiert bei den mit Patientenserum stimulierten Endothelzellen eine SMPD1-Antikörper-Assemblierung, die sich in konzentrierten Arealen vornehmlich an den Zellgrenzen deutlich vom restlichen, unspezifischen SMPD1-Färbungsmuster abhebt. Diese Domänen erscheinen bei den Kontrollserum-HMEC-1 in weitaus geringerem Ausmaß. Korrespondierend zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen A und B erscheint in dieser Aufnahme im roten Kanal ein charakteristisches Ceramid-Muster proinflammatorisch stimulierter Zellen. Im Gegensatz zu den mit Kontrollserum inkubierten Zellen präsentieren sich bei den Patientenserum-HMEC-1 multiple, intensive Ceramidmikrodomänen mit randständigem Charakter. In der *overlay*-Aufnahme wird bei den Patientenserum-HMEC-1 die Kolo-kalisation dieser Ceramid-*rafts* mit den spezifischen SMPD1-Domänen deutlich (orange Farbaddition). Grün verbleibende Strukturen zeigen keine räumliche Übereinstimmung zu Ceramid-Antikörpern und sind ein Indiz einer vermuteten Alexa 488<sup>®</sup>-Fluorophor-Internalisierung. 400fache Vergrößerung. Abstandsbalken entspricht 20µm. Repräsentative Abbildungen aus 20 unabhängigen Experimenten.

#### **4.4.2. Quantitative Detektion endothelialer Ceramid- und SMPD1-Intensitäten nach proinflammatorischer Stimulation**

In vorangegangenen Versuchen erfolgten quantitative Analysen des Sphingomyelinmetabolismus mittels densitometrischer Bestimmung der Produkte des hydrolytisch umgesetzten C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelins. Analog dazu vollzogen wir die fluoreszenzdensitometrische Auswertung mikroskopischer HMEC-1-Präparate, deren Ergebnisse nachfolgend präsentiert werden. Durch Einsatz eines geeigneten Analyseprogramms (Carl Zeiss LSM Image Examiner<sup>®</sup>) erfolgte die Intensitätsbestimmung der durch die spezifischen Antikörper markierten SMPD1- und Ceramidepitope im Endothelzellverband. Mittels 200facher Vergrößerung ließen sich pro mikroskopischen Aufnahmegebiet je nach Zellkonfluenz zwischen 12-36 Endothelzellen aus dem Gewebsverband visualisieren und untersuchen. Der vom Carl Zeiss Examiner<sup>®</sup> ermittelte, densitometrische Wert (in relativen Einheiten (rE)) spiegelt die gemessene Fluoreszenz-Gesamtintensität pro Aufnahmegebiet wider. Zur Gewinnung reliabler Datensätze wurde die gemessene Gesamtintensität pro Aufnahmegebiet durch die ermittelte Zellzahl pro Aufnahmegebiet dividiert. Dadurch war es möglich die SMPD1- und Ceramidintensitäten unabhängig von der Anzahl der Zellen im Gewebsverband auf einen vergleichbaren Quotienten zu übertragen. Der gesamte Messablauf erfolgte unter identischen konfokalmikroskopischen Scaneinstellungen (*pinhole*=1,0 *Airy unit*). Zur Untersuchung proinflammatorischer Effekte auf den Endothelzellverband erfolgte ein Vergleich von SMPD1- und Ceramidintensität folgender Gruppen:

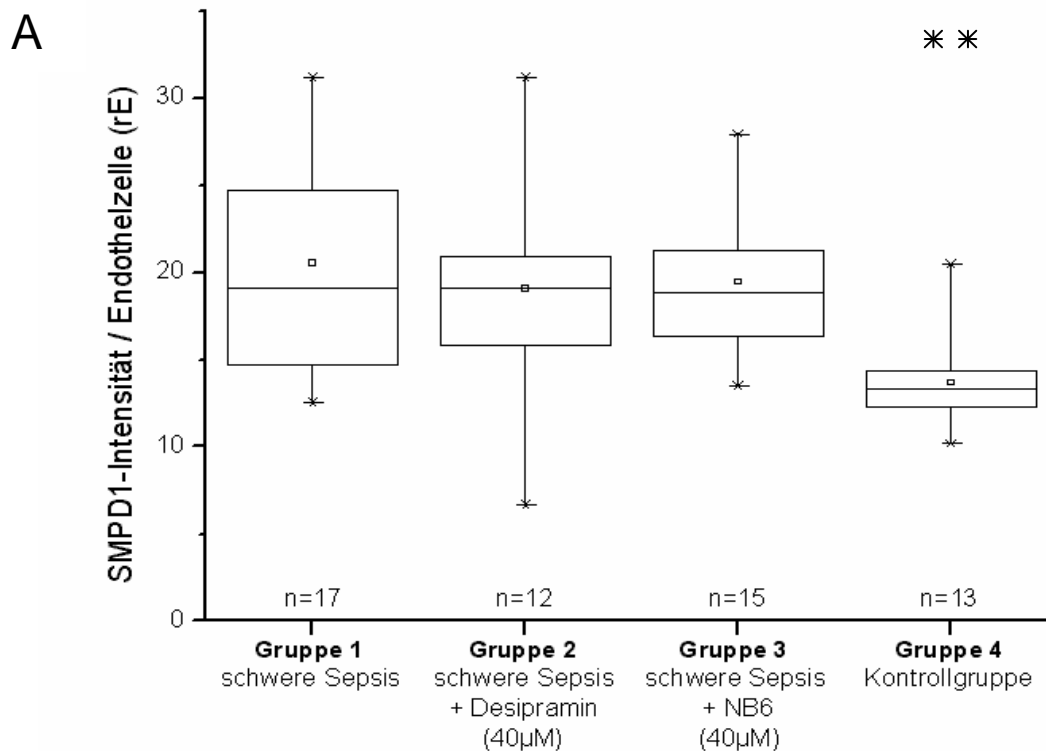
##### **Gruppe:**

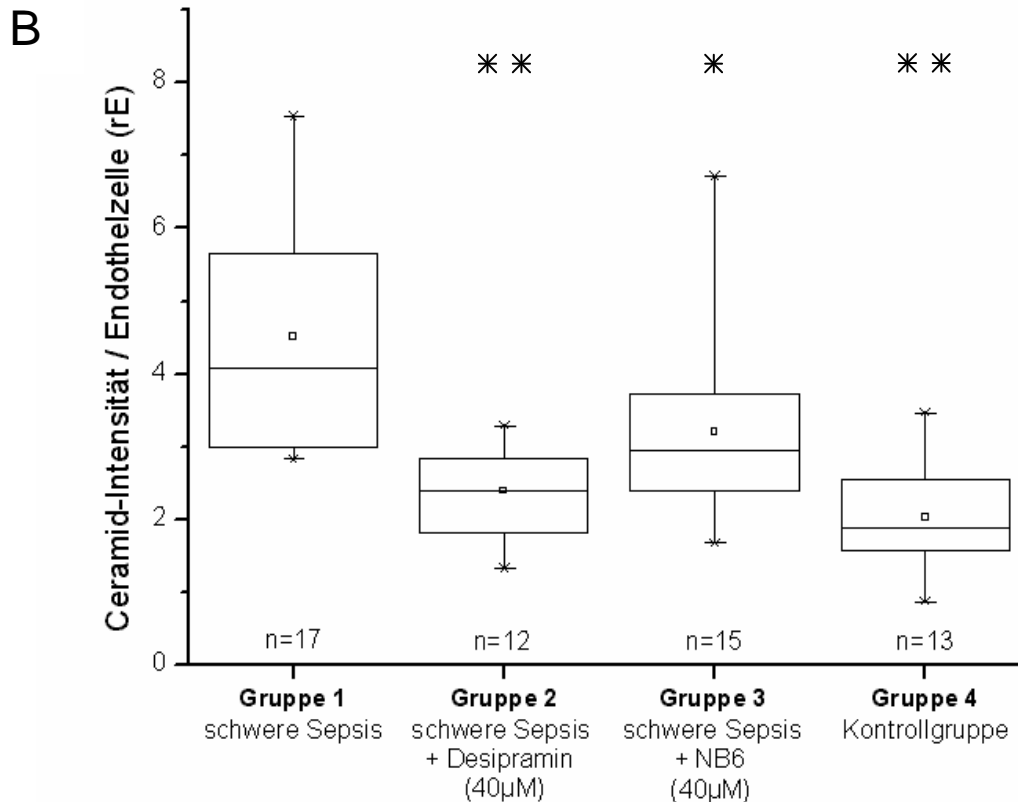
- (1) HMEC1 + 5% Patientenserum (schwere Sepsis)
- (2) HMEC1 + Desipramin (40µM; 30min Vorinkubation) + 5% Patientenserum (schw.Sepsis)
- (3) HMEC1 + NB6 (40µM; 30min Vorinkubation) + 5% Patientenserum (schwere Sepsis)
- (4) HMEC1 + 5% Kontrollserum

Da alle Versuchsgruppen normalverteilte Werte beinhalten, erfolgte die statistische Ergebnisauswertung mittels t-Test. Der fluoreszenzdensitometrische Vergleich der SMPD1-Intensitäten zwischen den Versuchsgruppen ist in Abbildung 18 dargestellt, die statistische Datenerhebung im Anhang aufgelistet sowie die zugehörige Wertepräsentation in Abbildung 17A aufgeführt. Keine signifikanten Unterschiede bezüglich der SMPD1-Detektion entstanden beim Vergleich zwischen Gruppe 1, Gruppe 2 und Gruppe 3. Im Gegensatz zu

diesen drei mit Patientenserum stimulierten Gruppen präsentierten sich die fluoreszenzmikroskopischen SMPD1-Werte der mit Kontrollserum behandelten HMEC-1 (Gruppe 4) als signifikant ( $p < 0,01$ ) erniedrigt.

Die Ergebnisse dynamischer Ceramidbildungsprozesse zwischen den Versuchsgruppen sind in Abbildung 17B graphisch dargestellt, die statistische Datenerhebung im Anhang aufgeführt sowie konfokalmikroskopische Aufnahmen in Abbildung 18 präsentiert. Korrespondierend zu den SMPD1-Intensitätsunterschieden zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4 stellt sich eine deutliche Differenz bezüglich der detektierten Ceramidintensität zwischen den beiden Gruppen dar. Die mit Patientenserum behandelten Endothelzellpräparate (Gruppe 1) präsentieren signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöhte fluoreszenzdensitometrische Signale gegenüber Gruppe 4. Zusätzlich zeigen sich die Ceramidwerte der mit den SMPD1-Hemmstoffen Desipramin (Gruppe 2) und NB6 inkubierten Gruppen (Gruppe 3) deutlich erniedrigt im Vergleich zur Patientenserum-Gruppe (Gruppe 1).

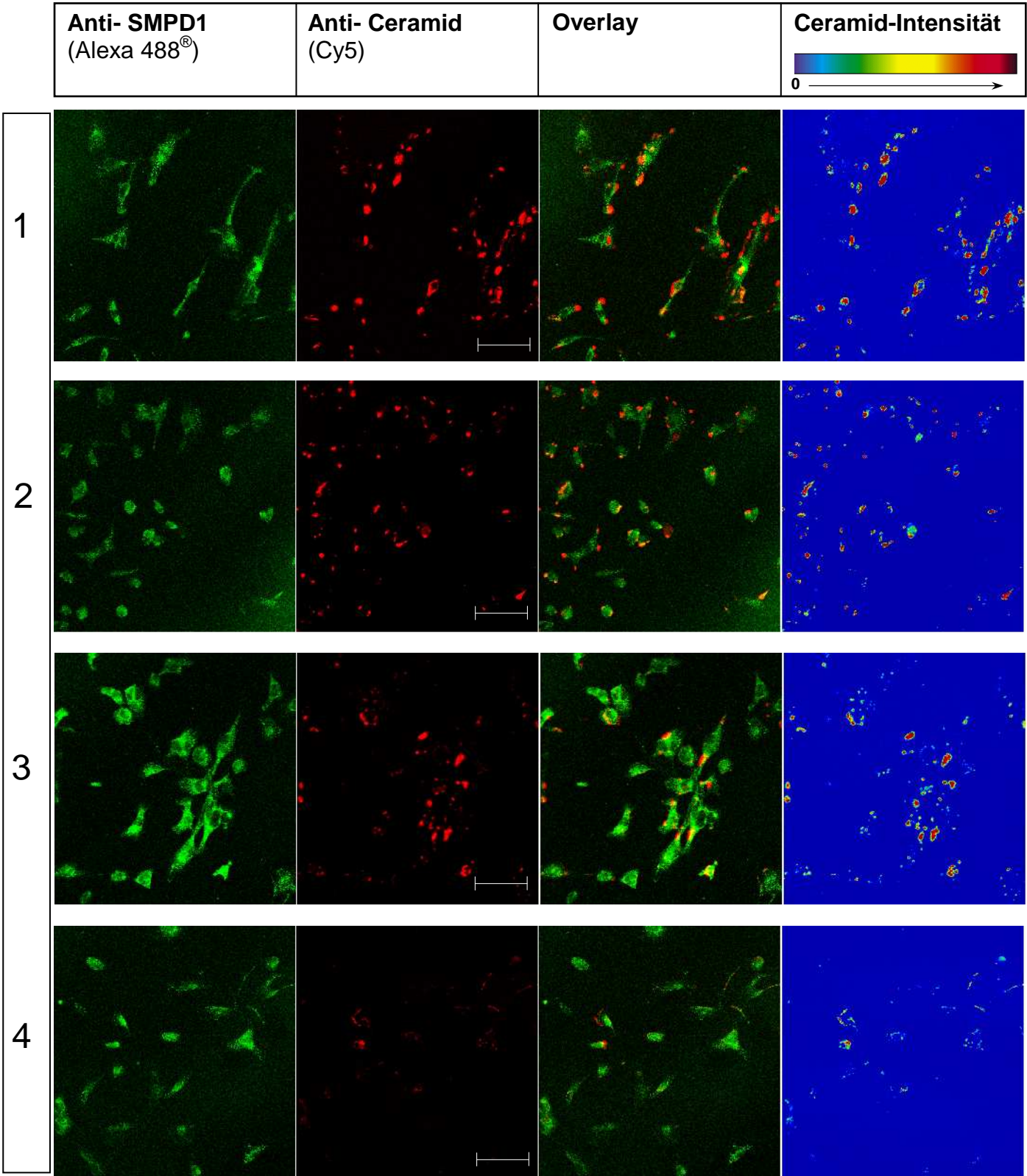




**Abb. 17: Endothelzellmembran-assoziierte Fluoreszenzintensitäten nach Stimulation.** Auf Deckglas subkonfluent gewachsener HMEC-1-Monolayer wurde 30min mit den Inhibitoren NB6 (40µM) oder Desipramin (40µM) inkubiert sowie anschließend für 20 min mit 5%igem Serum der Patienten oder Kontrollgruppe stimuliert. Nach Fixation mit Paraformaldehyd (5%) erfolgte die Blockierung unspezifischer Membranepitope mit BSA (1%) sowie anschließender Antikörperfärbung und Aufnahme der mikroskopischen Präparate unter identischen Scaneinstellungen (*pinhole*=1,0 *Airy unit* → identische Scanebene; *detector gain*=1,0). Übersichtsaufnahmen in 200facher Vergrößerung stellten den Gewebsverband subkonfluenter HMEC-1 dar, welcher mittels Carl Zeiss Image Examiner® fluoreszenzdensitometrisch analysiert wurde. Unterschiede gegenüber den Messwerten der Patientengruppe (Gruppe 1) wurden mit \* für  $p < 0,05$  sowie \*\* für  $p < 0,02$  dargestellt. Statistische Analyse erfolgte mittels t-Test für gepaarte Stichproben (Gruppe 1 vs. Gruppe 2; Gruppe 1 vs. Gruppe 3) sowie t-Test für unabhängige Stichproben beim Vergleich zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4.

**(A) Membran-assoziierte SMPD1-Intensitäten nach proinflammatorischer Stimulation.** Gegenüber den Werten der Patientenserum-Gruppe (Gruppe 1) zeigen sich die SMPD1-Intensitäten der mit Kontrollserum behandelten HMEC-1 (Gruppe 4) signifikant schwächer ( $p < 0,01$ ). Weiterhin erzielt der Einsatz der Inhibitoren Desipramin (Gruppe 2) und NB6 (Gruppe 3) keine signifikanten Unterschiede bezüglich der SMPD1-Intensität gegenüber der Patientenserum-Gruppe (Gruppe 1). Datenkollektiv aus 6 unabhängigen Experimenten.

**(B) Membranständige Ceramidgenerierung nach proinflammatorischer Stimulation.** Die Entstehung membranständigen Ceramids erweist sich nach HMEC-1-Stimulation mit Kontrollserum (Gruppe 4) als deutlich abgeschwächt ( $p < 0,01$ ) gegenüber der Ceramidgenerierung nach Stimulation mit Patientenserum (Gruppe 1). Die Effekte von Desipramin (Gruppe 2) und NB6 (Gruppe 3) erzielen inhibitorische Wirkung auf die Entstehung von Ceramid, dementsprechend präsentieren sich die Ceramidintensitäten von Gruppe 2 und Gruppe 3 signifikant geringer gegenüber den Ceramid-Werten von Gruppe 1. Die hemmenden Effekte von Desipramin zeigen bei diesem Versuch gegenüber der NB6-Hemmung eine stärkere Effizienz, sodass die Ceramidintensitäten der Gruppe 2 fast das basale Niveau der Kontrollgruppe erreicht. Datenkollektiv aus 6 unabhängigen Experimenten.





**Abb. 18: Dynamisches SMPD1- und Ceramid-Fluoreszenzsignalmuster des Endothelzellverbands nach proinflammatorischer Stimulation.** Zur Anfertigung mikroskopischer Präparate wurden subkonfluente, auf dem Deckglas adhärenente HMEC-1 30min mit den SMPD1-Inhibitoren Desipramin oder NB6 inkubiert sowie anschließend mit 5%igem Kontrollserum oder Patientenserum (schwere Sepsis) für einen Zeitraum von 20min stimuliert. Zur Untersuchung proinflammatorischer Effekte auf den Endothelzellverband wurden die Stimulationsversuche in folgenden Gruppen durchgeführt:

- (1) HMEC1 + 5% Patientenserum (schwere Sepsis, n=17)
- (2) HMEC1 + Desipramin (40µM; 30min Vorinkubation) + 5% Patientenserum (schw. Sepsis, n=12)
- (3) HMEC1 + NB6 (40µM; 30min Vorinkubation) + 5% Patientenserum (schwere Sepsis, n=15)
- (4) HMEC1 + 5% Kontrollserum (n=13)

Nach Fixation (5% Paraformaldehyd) und Blockierung unspezifischer Membranbindungen (1% BSA (HBSS)) erfolgte die jeweils zweistündige Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern. Unter identischen Scaneinstellungen erfolgte die Darstellung der Präparate mittels Carl Zeiss LSM 510 meta<sup>®</sup> sowie deren Auswertung mit dem zugehörigen Analyseprogramm Carl Zeiss Image Examiner<sup>®</sup>. Zur vergleichbaren Analyse der detektierten Intensitäten wurde pro mikroskopischen Aufnahme eine Mindestzellanzahl von 12 HMEC-1 festgelegt. Dargestellte Bilderserie bestehend aus Anti-SMPD1-Markierung (grüner Kanal, Alexa 488<sup>®</sup>), gefolgt von Anti-Ceramid-Markierung (roter Kanal, Cy5) sowie anschließender *overlay*-Darstellung (grüner + roter Kanal). Das letzte Bild gibt zur besseren Verdeutlichung der Signalstärke die Intensität des Ceramidmusters anhand des dargestellten Farbspektrums wider. Jede Versuchsserie wird durch die voranstehende Nummer eindeutig der Versuchsgruppe zugeordnet.

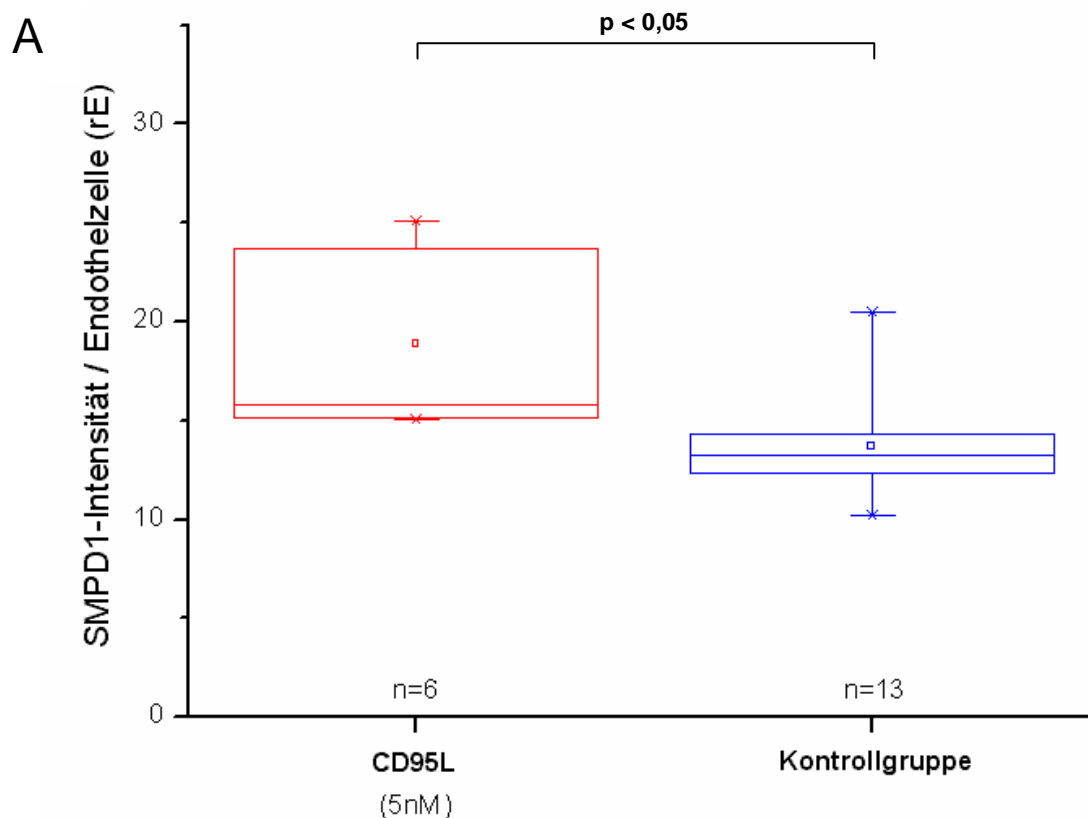
Bei der Untersuchung der fluoreszierenden Signale innerhalb des Endothelzellverbands wurde die gemessene Gesamtintensität pro Aufnahmegebiet ausgewertet und durch die ermittelte Zellzahl dividiert. Der so entstandene Quotient spiegelt die relative Signalstärke pro Zelle im Gewebe wider und dient als reliabler Wert.

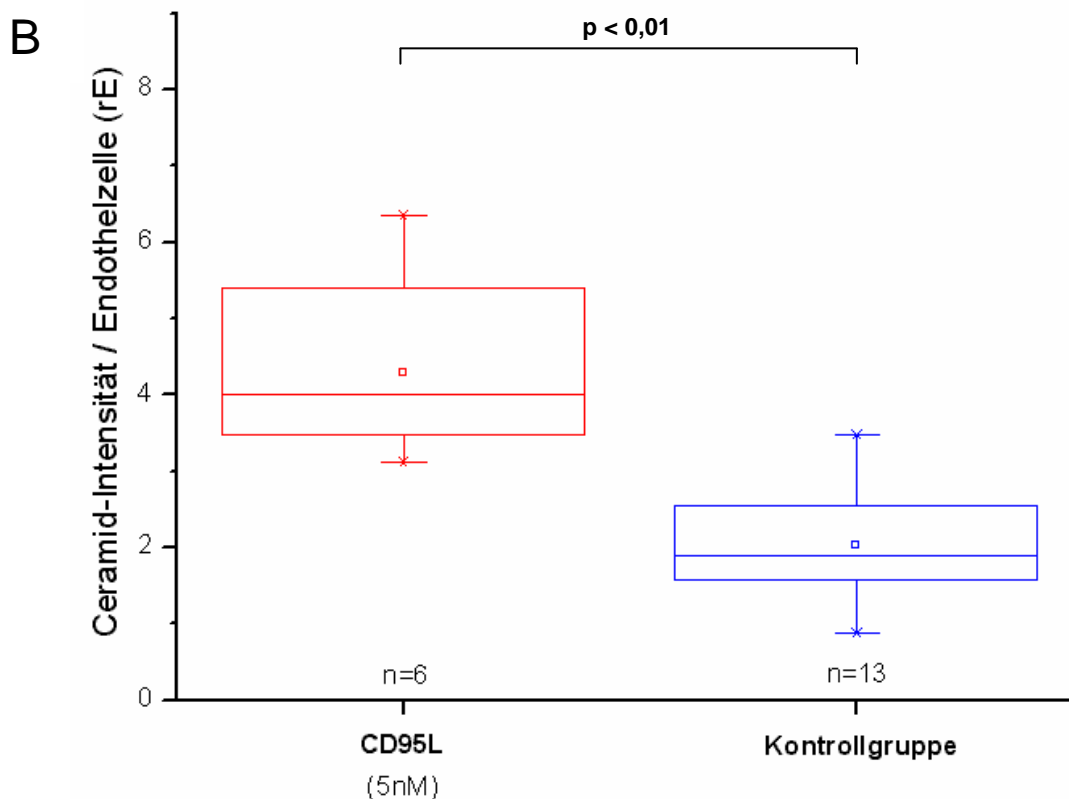
Repräsentative Aufnahmen aus jeweils 6 unabhängigen Experimenten. Abstandsbalken entspricht 100µm. Vergrößerung 200fach.

### **Validierung des fluoreszenzdensitometrischen Analyseverfahrens**

Die Arbeitsgruppe um Grassme und Gulbins et al. erbrachte bereits den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis, dass bei Lymphozyten und Fibroblasten nach CD95-Ligand-Stimulation (CD95L; FasL) eine gesteigerte zelluläre SMPD1-Sekretion sowie höhere Ceramidgenerierung detektiert werden konnte (Grassme, Jekle et al. 2001), (Gulbins 2003), (Fanzo, Lynch et al. 2003), (Grassme, Riehle et al. 2005). Den positiven Nachweis dieser beobachteten Effekte betrachteten wir als Ziel zur Etablierung der Validität der oben beschriebenen Methode. Daher erfolgte eine Überprüfung der von uns durchgeführten Intensitätsanalyse, indem wir CD95L (5nM) stimulierte HMEC-1 (n=6) gegenüber mit Kontrollserum stimulierten HMEC-1 (gesunde Kontrollen, n=13) bezüglich SMPD1- und Ceramidintensität quantitativ verglichen (Carl Zeiss LSM Image Examiner<sup>®</sup>) und mittels t-Test für unabhängige Stichproben auswerteten (Abb. 19A; B). Dabei wurde der identische Primärantikörper gegen Ceramid verwendet (Anti-Ceramid, 15B4).

Bei den mit CD95L stimulierten HMEC-1 betrug der Median der von uns gemessenen SMPD1-Intensitäten 15,8 rE ( $Q_{25\%}$ : 15,1 rE;  $Q_{75\%}$ : 23,7 rE) und erwies sich als signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht gegenüber den SMPD1-Werten der mit Kontrollserum behandelten Endothelzellen (Median: 13,3 rE;  $Q_{25\%}$ : 12,3 rE;  $Q_{75\%}$ : 14,3 rE) (Abb. 19A). Analog dazu zeigten sich die Ceramid-Intensitäten der mit CD95L stimulierten HMEC-1 (Median: 4,1 rE;  $Q_{25\%}$ : 3,5 rE;  $Q_{75\%}$ : 5,4 rE) ebenfalls deutlich stärker ( $p < 0,01$ ) gegenüber den Ceramidwerten der Kontrollen (Median: 1,9 rE;  $Q_{25\%}$ : 1,6 rE;  $Q_{75\%}$ : 2,6 rE) (Abb. 19B). Dementsprechend liefert der Vergleich der mittels Carl Zeiss LSM Image Examiner<sup>®</sup> analysierten Messdaten mit den von Grassme, Gulbins et al. beobachteten zelldynamischen Veränderungen als Ergebnis eine sinngemäße Übereinstimmung der genannten Effekte.





**Abb. 19: Gesteigerte endotheliale Sphingomyelinhydrolyse nach proapoptotischer CD95L-Stimulation.** Subkonfluente, auf Deckglas adhärenzte HMEC-1 wurden über einen Zeitraum von 20min mit CD95 Ligand (5nM) oder mit 5%igem Serum der gesunden Kontrollgruppe stimuliert und anschließend mit Paraformaldehyd (5%) fixiert. Nach Blockierung unspezifischer Membranepitope mit BSA (1%) erfolgte die Färbung mit Primär- und Sekundärantikörper. Unter identischen Scaneinstellungen (*pinhole*=1,0 *Airy unit* → identische Scanebene; *detector gain*=1,0) wurden die HMEC-1 in 200facher Vergrößerung mittels Carl Zeiss Image Examiner® fluoreszenzdensitometrisch bezüglich SMPD1- und Ceramidintensität quantitativ analysiert. Statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test für unabhängige Stichproben.

**(A) Signifikant gesteigerte SMPD1-Intensität nach CD95L-Stimulation.** Die proapoptotisch stimulierten HMEC-1 zeigen deutlich erhöhte SMPD1-Intensitäten gegenüber den Kontrollen ( $p < 0,05$ ). Ergebnisse aus 6 unabhängigen Experimenten.

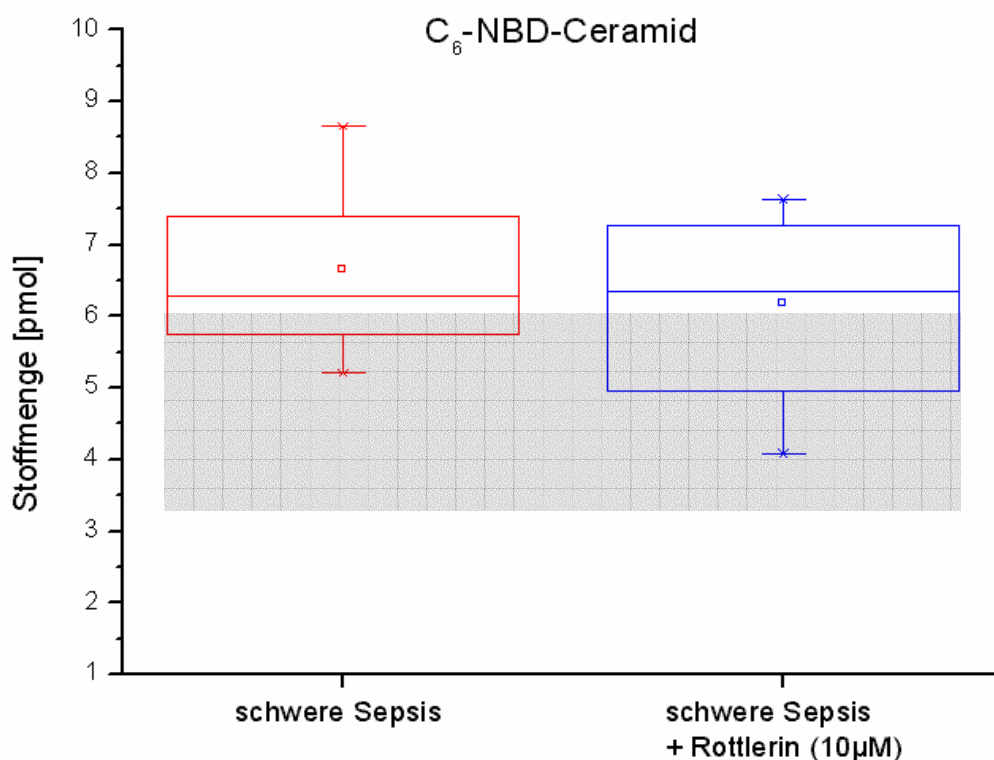
**(B) Verstärkte HMEC-1 Ceramidgenerierung nach CD95L induzierter, proapoptotischer Stimulation** Im Kontext zum gesteigerten endothelialen SMPD1-Nachweis lassen sich bei den CD95L-stimulierten HMEC-1 im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Ceramidintensitäten nachweisen. Darstellung aus 6 unabhängigen Experimenten.

#### 4.5. Inhibition endothelialer sSMPD1-Sekretion

##### 4.5.1. Modulierende Effekte der endothelialen SMPD1-Proteinsekretion durch Rottlerin

Zur genaueren Beobachtung der spezifischen, endothelialen sSMPD1-Sekretionsmechanismen untersuchten wir potentielle modulierende Effekte des Proteinkinase C-delta-Inhibitors (PKC- $\delta$ ) Rottlerin am humanen *in vitro* Endothelzellmodell (Kajimoto, Shirai et al.

2004). Die Rottlerin-induzierte Hemmung der PKC- $\delta$ -Enzymaktivität resultiert im Sinne veränderter posttranslationaler Modifikationen in fehlender Phosphorylierung bestimmter Enzymdomänen der SMPD1 (beispielsweise Serin 508) (Zeidan und Hannun 2007). Das Ausbleiben dieses enzymatischen Phosphorylierungsschrittes am SMPD1-Protein aufgrund PKC- $\delta$ -Inhibition resultiert in einer signifikant geschwächten zellulären sSMPD1-Sekretionsrate (Zeidan und Hannun 2007). Ein potientiell sSMPD1-Sekretionsdefizit könnte somit in unseren Versuchen durch Nachweis eines verminderten endothelialen Ceramidumsatzes nachgewiesen werden. Anhand dünnsschichtchromatographischer Analyse metabolisch gelabelter HMEC-1 ( $C_6$ -NBD-SM) erfolgte eine Bestimmung Rottlerin-spezifischer Effekte auf die sSMPD1-Aktivität bei proinflammatorischer Stimulation, welche in Abbildung 20 dargestellt ist. Nach 30minütiger HMEC-1 Inkubation mit Rottlerin erfolgte die Serumstimulation (n=6 Patientenseren) der  $C_6$ -NBD-SM-HMEC-1 für den Zeitraum von 20min. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede bei sSMPD1-abhängiger  $C_6$ -NBD-Ceramidentstehung zwischen der durch Rottlerin inkubierten Versuchsgruppe (Median: 6,3 pmol;  $Q_{25\%}$ : 4,9 pmol;  $Q_{75\%}$ : 7,3 pmol) und der Kontrollgruppe (Median: 6,6 pmol;  $Q_{25\%}$ : 5,7 pmol;  $Q_{75\%}$ : 7,4 pmol) festgestellt werden. Jedoch kann eine moderate, tendenzielle Verminderung der  $C_6$ -NBD-Ceramidgenerierung durch Rottlerin-vermittelnde Effekte in diesem *in vitro* HMEC-1 Versuch (n=6) vermutet werden.

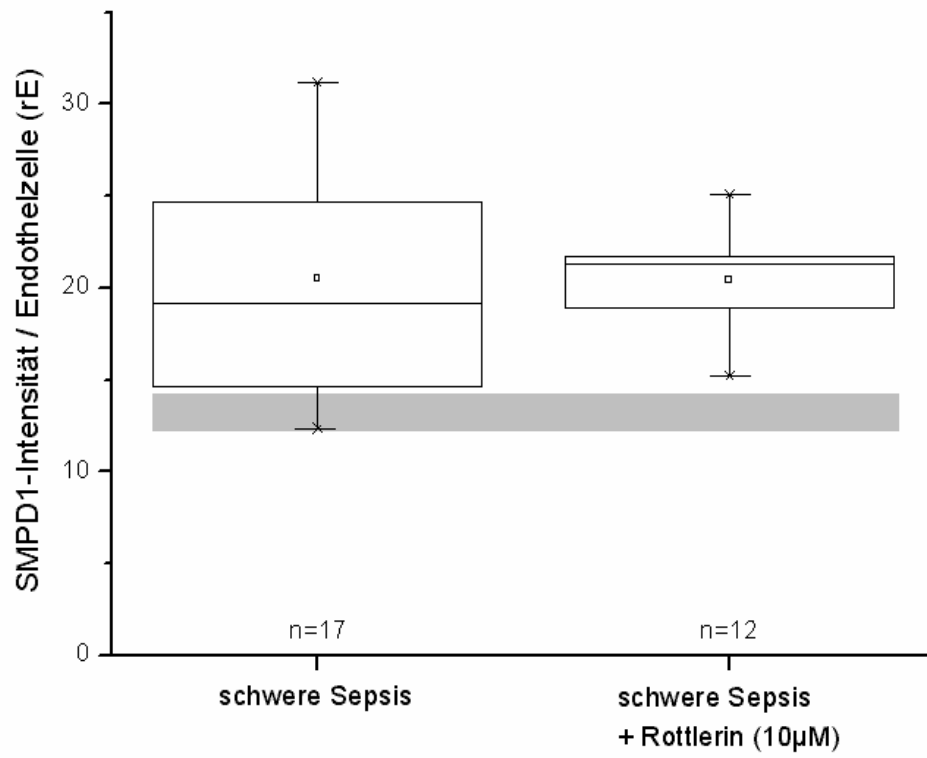


**Abb. 20: Modulierende Effekte der endothelialen SMPD1-Proteinsekretion durch den PKC- $\delta$ -Inhibitor Rottlerin.** Konfluente, mit C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin metabolisch gelabelte HMEC-1 wurden nach 30 minütiger Präinkubation (Rottlerin) mit Patientenserum (schwere Sepsis, n=6) für einen Zeitraum von 20min stimuliert, anschließend durch Lipidextraktion aufbereitet und dünnschichtchromatographisch ausgewertet. Bezüglich sSMPD1-abhängiger C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidgenerierung wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen dem inhibierten Versuchsansatz (schwere Sepsis + Rottlerin) und dem inhibitorfreien Ansatz (schwere Sepsis) ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test für gepaarte Stichproben. Allenfalls ist eine tendenzielle Verringerung der Rottlerin-Messwerte gegenüber den Kontrollwerten (schwere Sepsis) erkennbar. Zum Vergleich stellt der graue Balken die erniedrigte Ceramidgenerierung (Q<sub>25%</sub>-Q<sub>75%</sub>) nach HMEC-1 Stimulation mit 5%igem Serum gesunder Kontrollprobanden (n=24) dar.

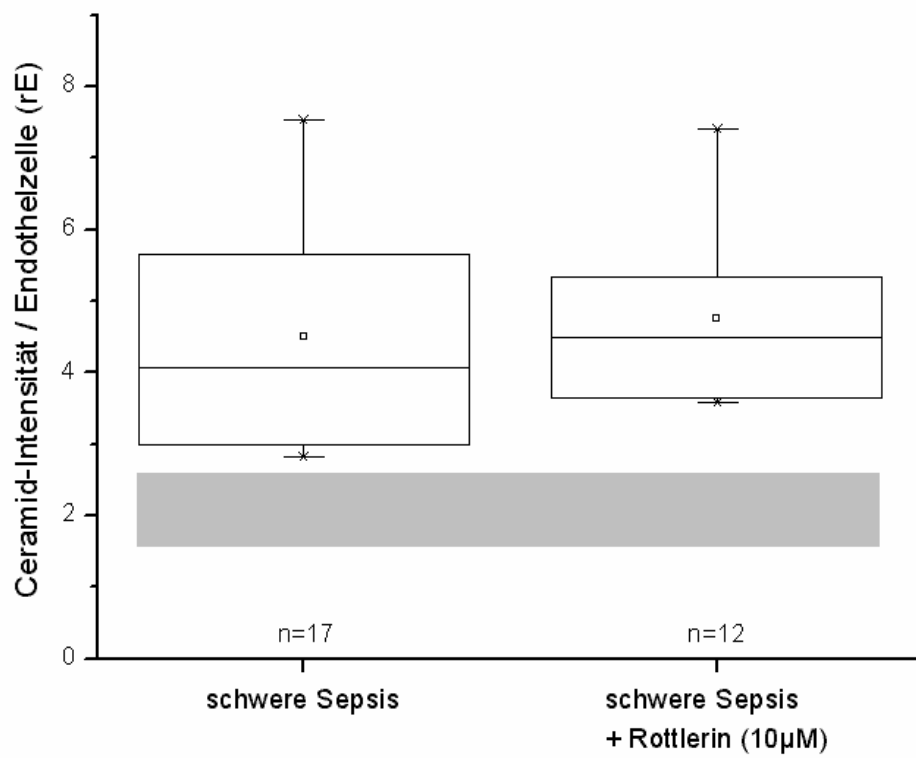
Neben der dünnschichtchromatographischen Auswertung Rottlerin-vermittelnder Effekte auf den Endothelzellverband erfolgte korrespondierend dazu die fluoreszenzdensitometrische Analyse (Carl Zeiss Examiner<sup>®</sup>) der Wirkungen des PKC- $\delta$ -Inhibitors am HMEC-1-Modell. Die unter Rottlerin-Inkubation detektierten SMPD1- und Ceramid-Fluoreszenzintensitäten der stimulierten, subkonfluent gewachsenen HMEC-1 sind in Abbildung 21 präsentiert. Hierbei wurden die in diesem Versuch gewonnenen Daten der Rottlerin-Gruppe (schwere Sepsis + Rottlerin 10 $\mu$ M) den bereits erhobenen Messwerten der Patientengruppe (schwere Sepsis) und der Kontrollgruppe (grauer Balken) graphisch gegenübergestellt. Bei Betrachtung der endothelialen SMPD1-Intensitäten (Abb. 21A) zeigte die mit Rottlerin (10 $\mu$ M) inkubierte Versuchsgruppe (Median: 21,3 rE; Q<sub>25%</sub>: 18,9 rE; Q<sub>75%</sub>: 21,7 rE; n=12) keine signifikanten Unterschiede zur mit Patientenserum (schwere Sepsis) stimulierten Kontrollgruppe (Median: 19,1 rE; Q<sub>25%</sub>: 14,7 rE; Q<sub>75%</sub>: 24,7 rE; n=17) im definierten 95%-Konfidenzintervall (t-Test). Im Gegensatz dazu stellen sich die SMPD1-Intensitäten der Endothelzellen, die mit Serum von Kontrollprobanden stimuliert wurden (Median: 13,3 rE; Q<sub>25%</sub>: 12,3 rE; Q<sub>75%</sub>: 14,3 rE; n=13), als signifikant erniedrigt (p<0,01) im Vergleich zu den beiden mit Patientenserum (schwere Sepsis) stimulierten Gruppen dar.

Die im identischen Versuch vom Carl Zeiss Examiner<sup>®</sup> ermittelten, fluoreszenzdensitometrischen Messwerte der HMEC-1-Ceramidintensitäten (Abb. 21B) präsentieren sich analog zu den korrespondierenden SMPD1-Daten. Während bei der mit Rottlerin inkubierten Versuchsgruppe (Median: 4,5 rE; Q<sub>25%</sub>: 3,7 rE; Q<sub>75%</sub>: 5,3 rE; n=12) keine signifikanten Unterschiede zu der Patientenserum-Gruppe (Median: 4,1 rE; Q<sub>25%</sub>: 3,0 rE; Q<sub>75%</sub>: 5,6 rE; n=17) auftraten, lagen demgegenüber die Ceramidintensitäten der Kontrollgruppe nach HMEC-1-Stimulation mit Serum gesunder Probanden deutlich erniedrigt (Median: 2,9 rE; Q<sub>25%</sub>: 2,4 rE; Q<sub>75%</sub>: 3,7 rE; n=13).

A



B



**Abb. 21: Rottlerin-spezifische Effekte auf endotheliale sSMPD1-Sekretion nach proinflammatorischer Stimulation.** Nach subkonfluentem Wachstum des HMEC-1-Monolayer auf dem Deckglas erfolgte die 30minütige Inkubation der Zellen mit dem PKC- $\delta$ -Inhibitor Rottlerin (10 $\mu$ M) mit anschließender Stimulation mit 5%igem Serum der Patienten oder Kontrollgruppe für 20 min. Nach Stimulationsende wurde die umgehende Fixation der mikroskopischen Präparate mit Paraformaldehyd (5%) sowie die Blockierung unspezifischer HMEC-1-Membranepitope mit BSA (1%) durchgeführt. Das darauf folgende Antikörperstaining membrangebundener SMPD1-(Alexa488<sup>®</sup>) und Ceramid-Epitope (Cy5) erfolgte über einen Zeitraum von 12h für die Primär- und 2h für Sekundärantikörper.

Die Aufnahme der mikroskopischen Präparate wurde unter identischen Scaneinstellungen (*pinhole*=1,0 *Airy unit*  $\rightarrow$  identische Scanebene; *detector gain*=1,0) ausgeführt. Gewonnene Übersichtsaufnahmen in 200facher Vergrößerung bilden Grundlage für die mittels Carl Zeiss Image Examiner<sup>®</sup> durchgeführte, fluoreszenzdensitometrische Auswertung, deren Ergebnisse hier graphisch dargestellt sind. Unterschiede gegenüber den Messwerten der Patientengruppe wurden mit \* für  $p<0,05$  sowie \*\* für  $p<0,02$  dargestellt. Statistische Auswertung wurde mittels t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt.

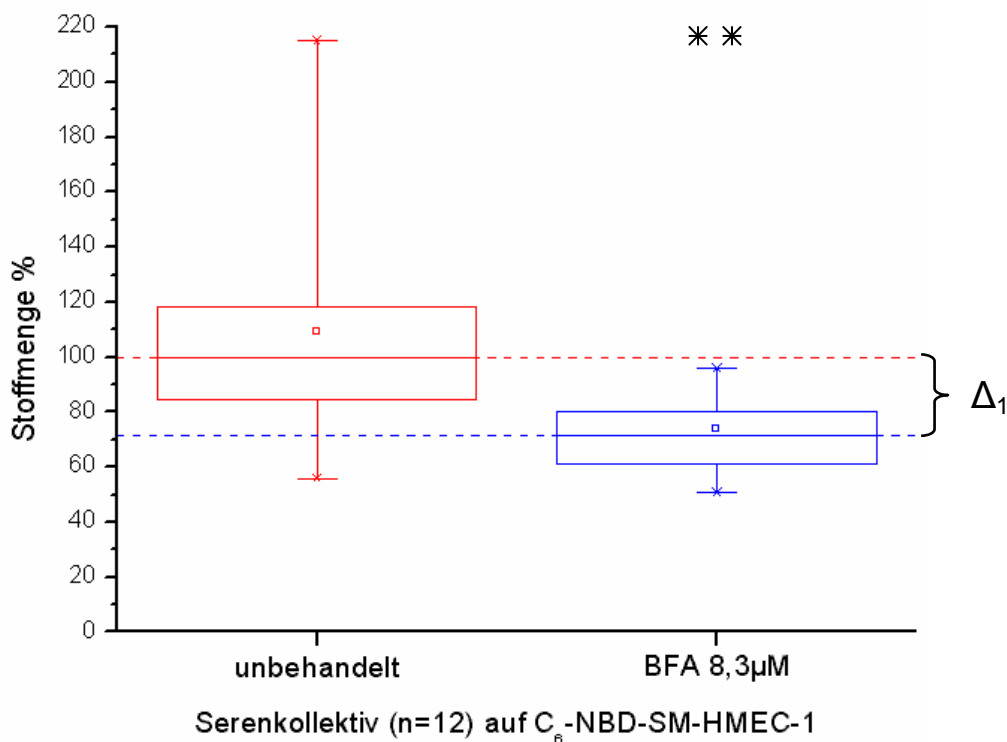
**(A) Einfluss von Rottlerin auf endotheliale SMPD1-Sekretion nach proinflammatorischer Stimulation.** Bei HMEC-1-Stimulation mit Patientenserum (schwere Sepsis) zeigt die vorher durchgeführte Inkubation mit Rottlerin (n=12) keine signifikanten Effekte gegenüber der nicht inhibierten Patientengruppe (n=17). Datenkollektiv aus 6 unabhängigen Experimenten. Diesen beiden Gruppen gegenüber stellt sich die bereits in vorhergehenden Versuchen ermittelte SMPD1-Intensität einer Kontrollgruppe (Serum gesunder Probanden; n=13) als deutlich vermindert dar ( $p<0,01$ ; grauer Balken ( $Q_{25\%}$ - $Q_{75\%}$ )).

**(B) Rottlerin-vermittelte Effekte membranassoziierter Ceramidgenerierung nach proinflammatorischer Stimulation.** Die Entstehung membranständigen Ceramids erweist sich nach HMEC-1-Stimulation mit Patientenserum als deutlich verstärkt ( $p<0,01$ ) gegenüber der Ceramidgenerierung nach Stimulation mit Serum gesunder Probanden (grauer Balken ( $Q_{25\%}$ - $Q_{75\%}$ )). Im Vergleich innerhalb der beiden mit Patientenserum stimulierten Versuchsgruppen kann die Vorinkubation mit Rottlerin keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich sSMPD1-abhängigen Sphingomyelinumsatzes und damit verbundener Ceramidgenerierung bewirken. Datenkollektiv aus 6 unabhängigen Experimenten.

#### 4.5.2. Inhibitorische Effekte von Brefeldin A auf endotheliale sSMPD1-Sekretion

Neben Untersuchungen des spezifischen PKC- $\delta$ -Inhibitors Rottlerin und dessen potentiellen Wirkungen auf spezifische, endotheliale sSMPD1-Sekretionsmechanismen, ermittelten wir mit Brefeldin A die Effekte eines weiteren Inhibitors auf den HMEC-1 Sphingomyelinmetabolismus. Die Wirkung von Brefeldin A (BFA), einem makrozyklischen Lacton-Antibiotikum, liegt in der unspezifischen Hemmung des intrazellulären Proteintransports sowie der zellulären Proteinsekretionshemmung (Klausner, Donaldson et al. 1992). Das als Metabolit aus dem Pilz *Eupenicillium brefeldianum* gewonnene Molekül blockiert dabei die Interaktion von Endoplasmatischem-Reticulum und Golgi-Apparat und verhindert somit vesikulären Transport (Nebenfuhr, Ritzenthaler et al. 2002), (Donaldson, Finazzi et al. 1992). Zur Beobachtung inhibitorischer Effekte auf die zelluläre sSMPD1-Sekretion wurde eine 30minütige Inkubation C<sub>6</sub>-NBD-markierter Endothelzellen mit BFA (c=8,3 $\mu$ M) vor anschließender Serumstimulation (n=12; 9 Patientenseren, 3 Kontrollseren)

durchgeführt. Dabei wurde bei den durch t-Test für gepaarte Stichproben analysierten Messergebnissen, ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,02$ ) in der C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidgenerierung beobachtet (Abb. 22). Zur besseren graphischen Darstellung der Stichprobenunterschiede wurde dem Median der C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidstoffmenge ein definierter Wert von 100% zugewiesen ( $Q_{25\%}$ : 83,5%;  $Q_{75\%}$ : 118,3%). In Abhängigkeit dazu erreichte der Median der mit BFA inkubierten Versuchsreihe einen relativen Wert von 72,2% ( $Q_{25\%}$ : 60,9%;  $Q_{75\%}$ : 80,2%). Der Abstand der beiden Mediane wurde als  $\Delta_1$  definiert und entspricht einer BFA-vermittelten, prozentualen Abnahme der sSMPD1-Aktivität von 27,8%.



**Abb. 22: Inhibitorische Effekte von BFA bezüglich endothelialer sSMPD1 Sekretion und C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidgenerierung.** Metabolisch gelabelte C<sub>6</sub>-NBD-SM-HMEC-1 wurden mit BFA (8,3µM) 30min inkubiert sowie anschließend mit 5%igem Serum stimuliert. Bei vorliegender Testung auf Brefeldin A-abhängige, inhibitorische Wirkungen auf den Sphingomyelinmetabolismus wurde eine signifikante Abnahme der C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidproduktion ( $p < 0,02$ ) detektiert. Unterschiede gegenüber den Messwerten der nicht inhibierten Kontrolle wurden mit \* für  $p < 0,05$  sowie \*\* für  $p < 0,02$  dargestellt. Aufgeführte Messwerte aus 12 unabhängigen Versuchen. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test für gepaarte Stichproben.



## 5. Diskussion

Entzündungsprozesse können sich durch ein komplexes Netzwerk verschiedener proinflammatorischer Faktoren präsentieren. Innerhalb dieses Spektrums vermitteln einige Metabolite des inerten Zellmembran-Lipids Sphingomyelin Schlüsselfunktionen in der Einleitung zellapoptotischer Prozesse. Ausgangssubstanz des vielschichtigen und weithin unerforschten Geflechts bioaktiver Sphingolipide stellt dabei Ceramid dar, dessen zellmodulierende Effekte auf teilweise unterschiedlichen Wirkungsprofilen basieren. Gesteigerte zelluläre Ceramid-Level sowie erhöhte Plasmaceramid-Werte stehen im engen Zusammenhang zu verstärkter Gewebsapoptose (Memon, Holleran et al. 2001) und systemisch inflammatorischer Aktivierung im chronischen als auch akuten Kontext (Doehner, Bunck et al. 2007), (Drobnik, Liebisch et al. 2003).

### 5.1. Die sSMPD1 bei systemischen Inflammationszuständen

Die Sphingomyelinasen determinieren sich dabei als Schrittmacherenzyme einer schnellen Ceramidgenerierung, wobei der sauren, sezernierten Isoform (sSMPD1) eine zentrale Stellung bei entzündungsassoziiertem Eingriff in den Sphingomyelinmetabolismus zugeschrieben werden kann (Claus, Bunck et al. 2005). Untersuchungen im Rahmen unserer Arbeitsgruppe sowie eigene Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine erhöhte sSMPD1-Aktivität im Blutkreislauf nicht nur in direktem Zusammenhang mit verschiedenen Inflammationszuständen wie Sepsis, SIRS oder chronisch rheumatischen Krankheitsbildern steht, sondern auch Interpretationen zum Verlauf und Schweregrad der Entzündung gestattet (Doehner, Bunck et al. 2007).

Anhand direkter, funktioneller Enzym-Aktivitätsbestimmung erwies sich in unseren Untersuchungen die sSMPD1-Serumaktivität des Patientenkollektivs mit Diagnose „schwere Sepsis“ um den Faktor 3,2 erhöht gegenüber der Serumaktivität einer gesunden Kontrollgruppe. Wir konnten dementsprechend bestätigen, dass akute Entzündungsprozesse, die wie schwere Sepsis lebensbedrohliche Ausmaße annehmen können, mit einer deutlichen Aktivierung des plasmatischen sSMPD1-Pools einhergehen.

Ergänzend dazu wurden in bereits durchgeführten Projekten unserer Arbeitsgruppe bei der Verlaufsbeurteilung der sezernierten Sphingomyelinase kritisch kranker Sepsispatienten signifikante Änderungen in der zeitlichen Serumaktivität festgestellt. Die Patientengruppe,

welche an der schwerwiegenden Krankheit verstarb (NS) sowie die Patientengruppe, die von der ICU entlassen wurde (S), zeigten beide nahezu identische, aber erhöhte sSMPD1-Serumaktivitäten (NS 247,6 pmol/(ml\*h) versus S 264,7 pmol/(ml\*h)) am Tag der Diagnosestellung (Claus, Bunck et al. 2005). Während die *Survivor*-Gruppe (S) bei Verlegung von der ICU auf Normalstation deutlich erniedrigte sSMPD1-Werte aufwies (151,7 pmol/(ml\*h)), hatte die *Non-Survivor*-Gruppe beim letztmöglichen Messzeitpunkt eine deutlich erhöhte sSMPD1-Aktivität zu verzeichnen (441,3 pmol/(ml\*h)) (Claus, Bunck et al. 2005).

Korrespondierend zu den in unserer Arbeitsgruppe gewonnenen, klinischen Beobachtungen konnten Göggel et al. am Beispiel des PAF (Plättchen-aktivierender Faktor)-induzierten Lungenversagens im Mausmodell einen weiteren wichtigen Aspekt des aktivierten Sphingomyelinmetabolismus darstellen. Hierbei spielte die durch PAF getriggerte, erhöhte sSMPD1-Serumkonzentration sowie die damit verbundene zelluläre Ceramidanreicherung eine Schlüsselrolle beim Entstehen der akuten Schocklunge (Göggel, Winoto-Morbach et al. 2004). Interessanterweise zeigten *smpl1*<sup>-/-</sup>-Mäuse nach PAF-Stimulation keine gesteigerte pulmonale Ceramidakkumulation. Dieser Effekt macht deutlich, dass die erhöhte sSMPD1-Konzentration im pulmonalen Blutkreislauf eine durch Ceramid vermittelte proinflammatorische Aktivierung des lokalen Endothels initiiert. Das aufgrund des Endotheldefekts entstandene Lungenödem wurde bei Kontrollversuchen, die durch eine deutlich herabgesetzte sSMPD1-Serumaktivität charakterisiert waren, nicht nachgewiesen (Göggel, Winoto-Morbach et al. 2004).

Bei erst kürzlich erfolgten Untersuchungen des hepatischen Sphingolipid-Stoffwechsels nach Leberteileresektion am Tiermodell der Ratte konnten Zabielski et al. eine ausgeprägte Akkumulation verschiedener, in den Apoptoseprozeß eingebundener Sphingomyelin-Zwischenprodukte wie Ceramid, Sphingosin oder Sphingosin-1-Phosphat feststellen (Zabielski, Baranowski et al. 2007). Damit einhergehend wurde innerhalb der ersten 24 Stunden nach Eingriff die hochregulierte Aktivität der sauren und neutralen Sphingomyelinase sowie verschiedener Ceramidasen ermittelt, welche in ihrer Gesamtheit relevante Schlüsselenzyme des proinflammatorisch stimulierten Sphingomyelinmetabolismus darstellen.

Laut Llacuna et al. induziert hingegen Reperfusion nach Hemihepatektomie, Lebertransplantation oder anderen ischämischen Zuständen vornehmlich eine rasche

Aktivierung der zellulären SMPD1, wogegen andere Sphingomyelinase-Isoformen unbeeinflusst bleiben (Llacuna, Mari et al. 2006). Diese am murinen Modell analysierten Effekte korrespondieren ebenfalls mit einer verstärkten hepato-zellulären Ceramidanreicherung, welche als eine Ursache des großflächigen Leberzelluntergangs nach Ischämie/Reperfusion angesehen wird. Demzufolge scheint die erhöhte Aktivität der hepatischen sauren Sphingomyelinase in engem Zusammenhang mit postaggressiven traumatischen Zuständen zu korrelieren sowie lokale und systemische Entzündungsantworten zu beeinflussen (Zabielski, Baranowski et al. 2007).

Darüber hinaus konnten Lang et al. kürzlich nachweisen, dass die SMPD1 in einem unmittelbaren Zusammenhang mit der Pathogenese der autosomal-rezessiv vererbten Kupferspeicherkrankheit Morbus Wilson steht (Lang, Schenck et al. 2007). Das bei dieser Krankheit verstärkt anfallende  $\text{Cu}^{2+}$  aktiviert dabei die saure Sphingomyelinase in Leukozyten und Hepatozyten, woraufhin diese durch gesteigerte Ceramidgenerierung proapoptotisch stimuliert werden. Die  $\text{Cu}^{2+}$ -induzierte Apoptose, welche nach den Beobachtungen der Forschungsgruppe in Leberzirrhose bis hin zum Organversagen resultiert, konnte mittels SMPD1-Inhibition durch Amitriptylin weitestgehend verhindert werden und wurde an *smpd1*<sup>-/-</sup> Ratten nicht beobachtet (Lang, Schenck et al. 2007).

Auch die Situation nach größeren kardiochirurgischen Eingriffen (Herz-Lungen-Maschine) gegenüber minimalinvasiven Herz-Operationen geht einher mit einer signifikanten Zunahme der plasmatischen sSMPD1-Aktivität und korreliert interessanterweise mit einem gesteigerten Risiko, ein postoperatives SIRS zu entwickeln (Claus, Bunck, bisher unpublizierte Daten).

Die aufgeführten Beispiele suggerieren mannigfaltige *Foci* im Säugetierorganismus, bei denen die saure Sphingomyelinase unter verschiedenen Stress- und Inflammationszuständen im Körper eine ausschlaggebende Rolle zu spielen scheint. Dieses Erkenntnis verstärkt somit die Hypothese, dass die SMPD1 in der Summe der lokalen Effekte nicht nur systemische Präsenz zeigt, sondern auch systemische Wirkung entfaltet. In diesem Zusammenhang stellt sich weiterhin die maßgebliche Frage, inwiefern der sezernierten Sphingomyelinase generell eine Rolle als Effektor oder Resultante bei Inflammationsreaktionen zugesprochen werden kann.

## 5.2. Die sSMPD1 im Kontext zu klinischen Entzündungsparametern

Die in unserem Projekt durchgeführte Einzelfallstudie an einem 13jährigen männlichen Patienten mit Makrophagenaktivierungssyndrom stellt eine Verlaufsbeobachtung verschiedener, im Blut zirkulierender Inflamationsparameter, einschließlich der sSMPD1-Aktivität dar. Das MAS präsentiert sich als schwer klassifizierbares Entzündungssyndrom mit rheumatischer und autoimmunologischer Komponente. Die systemische Entzündungsreaktion ließ sich klinisch sowie labordiagnostisch aufgrund hochregulierter Entzündungsparameter wie CrP, Procalcitonin und LDH nachweisen. Wie zu erwarten, zeigte die sSMPD1-Serumaktivität dieses Patienten zu Beginn der Labordiagnostik ca. 2,5fach erhöhte Werte im Vergleich zu Normalwerten eines gemessenen gesunden, allerdings nicht altersgematchten Probandenkollektivs. Mit Beginn intensivmedizinischer Versorgung sowie Einleitung einer Antizytokintherapie (Anakinra: IL-1 $\beta$  Antagonist) sank die sSMPD1-Serumaktivität bis auf einen Rückfall stetig um ca. 40% bis auf annähernde Normalwerte (1,4fach erhöht). Ein ähnlicher zeitlicher Verlauf wurde in unserer Arbeitsgruppe bei der Bestimmung der sSMPD1-Serumaktivität kritisch kranker Sepsispatienten festgestellt (Claus, Bunck et al. 2005). Dabei zeichnete sich die Patientengruppe, welche die schwere Sepsis überstand und von der ICU auf Normalstation verlegt werden konnte (*survivor* (S)), durch deutlich gefallene Werte aus. Interessanterweise lässt sich jedoch bei diesen Patienten (151,7 pmol/(ml\*h)) als auch beim Patienten mit MAS (171,4 pmol/(ml\*h)) am Ende des Messzeitraums eine immer noch deutlich erhöhte sSMPD1-Serumaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (118,4 pmol/(ml\*h)) nachweisen.

Zum Ende der Messreihe (+24 Tage) zeigte sich der Patient klinisch stabil und wurde von der Intensivstation verlegt. Diese Beobachtungen stellen in Übereinstimmung zu bisherigen wissenschaftlichen Experimenten erneut dar, dass die sSMPD1-Serumaktivität bei verschiedensten Ausprägungen einer systemischen Entzündungsreaktion in erhöhter Konzentration vorzufinden ist.

An dem aktuellen Beispiel des MAS lassen sich diese Aussagen bestätigen. Vielmehr noch lässt die positive Korrelation der hier gemessenen Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase zu einigen Inflamationsmarkern wie CrP ein Vorhersagepotential der sSMPD1 zum Verlauf und der Schwere von Inflamationszuständen vermuten. Um klinisch prädiktive Qualität (Relevanz) zu erlangen, müsste jedoch die sSMPD1-Serumaktivität in standardisierten Analyseverfahren in großem Umfang sowie in Zusammenhang zu

verschiedenen Krankheitsbildern bestimmt und ausgewertet werden. Dazu müssten zusätzlich methodische Testverfahren etabliert werden, die eine rasche Wertebestimmung bei adäquater Spezifität und Sensibilität gewährleisten.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Dynamik des im Serum enthaltenen sSMPD1-Pools ist die Abhängigkeit von der Präsenz proinflammatorischer Zytokine im Blut. Im Zuge dessen ermittelten Delogu et al. unter anderem den positiven Zusammenhang zwischen der Höhe plasmatischer TNF- $\alpha$ -Spiegel im Verhältnis zu monozytären Ceramidkonzentrationen, deren Ausprägung mit dem Patienten-*Outcome* korrelierte und einen möglichen Vorhersagewert bei der Entwicklung eines MODS widerspiegelt (Delogu, Famularo et al. 1999). Bei den von Lightle et al. durchgeführten Beobachtungen am Menschen sowie Studien am Mäusemodell wurde festgestellt, dass nach einer akuten Inflamationsreaktion, induziert durch LPS, innerhalb weniger Stunden bis zu 10fach erhöhte Ceramidkonzentrationen in verschiedenen Lipoprotein-Fractionen im Blut entstanden. Diese Effekte lassen sich hierbei in erster Linie durch die ebenfalls gemessene, verstärkt auftretende sSMPD1-Aktivität im Serum erklären (Lightle, Tosheva et al. 2003). Insofern gehören TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  sowie Endotoxin zu den Hauptstimulatoren der SMPD1-Produktion und Sekretion (Wong, Xie et al. 2000), (Marathe, Schissel et al. 1998), (Colell, Morales et al. 2002).

Bezüglich der Einzelfallstudie am MAS-Patienten ist der Abfall der Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase demzufolge zumindest partiell auf den Einfluss des applizierten IL-1 $\beta$  Antagonisten zurückzuführen. Zusätzlich kam es vermutlich im Verlauf der Behandlung durch eingesetzte Immunsuppressiva zu einem generellen Rückgang der entzündungsfördernden Zytokine, wodurch die sSMPD1-Sekretionsrate abgeschwächt wurde. Die Ergebnisse eines weiteren, bisher unveröffentlichten Forschungsprojekts unserer Arbeitsgruppe bekräftigen diese Theorie. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die bei der rheumatoiden Arthritis (RA) erhöht auftretende SMPD1-Aktivität im Verlauf einer TNF $\alpha$ -blockierenden Therapie mit Adalimumab (Humira®) gesenkt werden konnte (Claus, Henninger, Stuhlmüller, Kinne et al.; bisher unveröffentlichte Daten).

Anhand der aufgeführten Beispiele konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte sSMPD1-Serumaktivität in Zusammenhang zu verschiedenen Inflammationszuständen und Krankheitsbildern vorzufinden ist. Es wird deutlich, dass die sSMPD1-Serumkonzentration teilweise empfindlichen Regulationsprozessen, wie der plasmatischen Zytokinzusammensetzung unterliegt. Trotz bisheriger Erkenntnisse über SMPD1-Enzymaktivität sowie dessen Stellung im Sphingomyelinmetabolismus und Wirkweise bei

Inflammationszuständen bleiben jedoch viele Aspekte ungeklärt. Eine der vordergründigsten Aufgaben zur Entwicklung eines genaueren Verständnisses ist dabei, die pathophysiologischen Mechanismen zu entschlüsseln, die das fehlende Bindeglied zwischen der Aktivität der sauren Sphingomyelinase und dem inflammatorischen Krankheitsbildern darstellen.

### **5.3. Endothelzellen als inflammatorisch kompetente Strukturen**

Durch Verwendung eines humanen *in vitro*-Modells metabolisch fluoreszenzmarkierter Endothelzellen (HMEC-1) waren wir in der Lage, spezifische Wirkungen der sSMPD1 auf Ebene des Gewebsverbands zu untersuchen sowie deren Effekte auf zellulärer Ebene zu visualisieren. Die Auswahl humaner Endothelzellen bürgt einerseits den Vorteil, einen relativ sekretionsaktiven Gewebetyp zu untersuchen (Marathe, Schissel et al. 1998), andererseits vermittelt der direkte Kontakt zum zirkulierenden Blutkreislauf, der das Endothel zum *first-hit-point* bei systemischen Inflamationsprozessen deklariert, vielversprechende und klinisch relevante Beobachtungen. Die von Göggel et al. beschriebenen sSMPD1-vermittelten Effekte bei murinen Endothelzellen unterstreichen die Sensibilität dieser Gewebssklasse auf die hydrolytische Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase (Goggel, Winoto-Morbach et al. 2004). Dadurch wird erneut die Schlüsselposition deutlich, die das Endothel bei systemischen Dysregulationen vermittelt.

Die in diesem Kontext durchgeführten Zellstimulationen mit Patienten- und Kontrollseren simulierten ein weitestgehend authentisches Versuchsmodell, welches Formulierungen zur endothelialen Dynamik und Regulation des Sphingomyelinmetabolismus erlaubt.

### **Methodenkritik: Metabolisches Labelling von HMEC-1**

Ein Hauptaspekt unserer wissenschaftlichen Bemühungen ist es, die Effekte der sezernierten Isoform der sauren Sphingomyelinase an menschlichen Endothelzellen zu beobachten. Das metabolische Labelling der HMEC-1 mit kommerziellem C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin ist dabei eine vorteilhafte und vereinfachende Methode, um wichtige Schritte des endothelialen Sphingomyelinmetabolismus zu analysieren. Aufgrund der leichten Detektierbarkeit der fluoreszierenden Substanzen sowie der Einsetzbarkeit bei intakter Zellkonstitution ist diese Variante der metabolischen Markierung auch bei anderen Forschungsgruppen unter Einbeziehung vielfältigster Zelltypen im Einsatz (Babia, Ledesma et al. 2001), (van der Bijl, Lopes-Cardozo et al. 1996), (van Helvoort, Giudici et al. 1997), (van Meer und van 't Hof

1993). Die Nachteile dieser Methode liegen in dem noch nicht vollständig geklärten biochemischen Verhalten der C<sub>6</sub>-NBD-Sphingolipide gegenüber den natürlichen Pendants innerhalb der Zellmembran. Hierbei könnten durch den Einbau des NBD-Fluorophors in die Membran potentielle, unphysiologische Interaktionen auftreten, die in einem unnatürlichen Zustand resultieren. In unseren Auswertungen konnten wir jedoch aufgrund valider Messungen und plausibler Messdaten hinsichtlich einer unveränderten zellulären Morphologie keine Rückschlüsse auf ein potentiell unphysiologisches Verhalten von C<sub>6</sub>-NBD-Sphingolipiden in der Membran finden. Darüberhinaus waren wir uns bewusst, dass die analysierten C<sub>6</sub>-Sphingolipide eine relativ kurzkettige Variante und somit nur einen geringen Teil des komplexen zellulären Sphingolipidpools (C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>) widerspiegeln. Da die SMPD1 jedoch ihre hydrolytische Wirksamkeit unabhängig von der Substratkettlänge entfaltet, können wir die am C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelinmetabolismus beobachteten Effekte mit großer Wahrscheinlichkeit auf das generelle zelluläre Verhalten des physiologisch auftretenden Sphingolipidpools transferieren.

Im Voraus zu den HMEC-1-Stimulationsversuchen untersuchten wir standardmäßig die Aktivität der sauren Sphingomyelinase unter Reaktionsbedingungen, die sich durch neutralen pH-Wert und eine physiologische Zinkkonzentration auszeichneten und grundsätzlich mit den Reaktionsbedingungen des Blutkreislaufs, dem postuliertem Wirkort der sezernierten Sphingomyelinase, vergleichbar sind. Ziel dabei war es zu überprüfen, ob und inwiefern unter diesen physiologischen Bedingungen tatsächlich ein C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelinumsatz im HMEC-1-Zellkulturmedium stattfindet. Die Ergebnisse zeigen hierbei eine lineare Abhängigkeit zwischen SMPD1-Aktivität und Substratumsatz, welche sich gegenüber der Enzymaktivität unter idealen Voraussetzungen (pH 5, Zn<sup>2+</sup>-Konzentration: 2mM) aufgrund des höheren pH-Wertes erwartungsgemäß als deutlich vermindert (~Faktor 200-600) darstellt (Schissel, Jiang et al. 1998). Jedoch kommt die von uns gemessene lineare Korrelation der im sauren Milieu unter optimalen Bedingungen untersuchten Abhängigkeit zwischen Enzym und Hydrolyseprodukt sehr nahe, sodass sich die Aussagen bezüglich SMPD1-Kinetik unserer Meinung nach weitestgehend uneingeschränkt am HMEC-1-Modell formulieren lassen.

Anhand zusätzlicher, fluoreszenzmikroskopischer Versuche am humanen Endothel, welche ohne Einbau von C<sub>6</sub>-SM-NBD erfolgten, konnten wir eine sinngemäße Kontrolle der Methodik des metabolischen Labellings von HMEC-1 durchführen. Da die gewonnenen Daten der beiden unterschiedlichen Versuchsabläufe übereinstimmen, lässt sich die hier kritisierte Verwendung der Substanz C<sub>6</sub>-SM-NBD legitimieren und bekräftigen. In einem wertenden

Überblick erweist sich somit die Methode des metabolischen C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin- Labellings als ein adäquates Mittel, um die sSMPD1-Aktivität anhand der Produktmenge direkt zu bestimmen.

### **Methodenkritik: Konfokalmikroskopische Analyseverfahren**

Der Einsatz des Carl Zeiss Laser Scanning Mikroskops LSM 510 meta<sup>®</sup> ermöglicht die simultane Abbildung mehrerer Strukturen mit different fluoreszierenden Konjugaten und stellt somit eine fortschrittliche und qualitativ hochwertige Form der Bildgebung dar (Weissart, Jungel et al. 2004), (Anderson, Sanderson et al. 2006). Gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Anwendung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie die präzise Darstellung kolokalisierter Strukturen, wodurch es uns gelang, vorliegende Fragestellungen auf zellulärer Ebene erfolgreich zu erforschen. Primäre Zielstellung war es, strukturelle Veränderungen der humanen Endothelzelle nach proinflammatorischer Stimulation zu untersuchen (Vergrößerung 400fach). Die verfügbaren Messoptionen des Mikroskops waren auf diese Art der Auswertung exakt zugeschnitten und lieferten schlüssige und stichhaltige Ergebnisse. Färbetechnisch bedingtes Hintergrundrauschen sowie Antikörperartefakte traten in seltenen Fällen auf und stellten dann eine nur unwesentliche Beeinflussung der Bildqualität und –aussagefähigkeit dar. Aufgrund der sehr guten Spezifität und stabilen Sensitivität ausgewählter konjugierter Antikörper sowie der optimalen Ausschöpfung verfügbarer Messoptionen gelang uns der Gewinn reliabler und gut interpretierbarer fluoreszenzmikroskopischer Bilder. Der durchgeführte Spezifitätsnachweis eingesetzter Antikörper führte zu adäquaten positiven Negativkontrollen, welche sich einerseits durch nicht vorhandene Interaktionen zwischen Antikörper und Endothelzelle sowie die nicht vorherrschende Kreuzreaktivität der Antikörper untereinander auszeichneten.

In weiteren Versuchen wurde bei Betrachtung des Endothelgewebes (Vergrößerung: 200fach) anhand einer im Carl Zeiss Examiner<sup>®</sup> integrierten Analysefunktion die Gesamtintensität gewählter Fluoreszenzsignale pro Bildabschnitt errechnet. Die gewonnenen Daten erlaubten somit quantitative Aussagen zum Sphingomyelinmetabolismus auf Ebene des unmittelbaren Endothelzellverbands. Dabei waren wir uns bewusst, dass anhand mikroskopischer Bilder keine absoluten quantitativen Aussagen getroffen werden können, sondern mit der Fluoreszenzmikroskopie eine eher beweisende Methode zur Anwendung kommt. Dennoch betrachteten wir die mittels zugehöriger Software durchgeführten, quantitativen Analysen als legitim, da sich die Daten durch hohe Reproduzierbarkeit und biologisch plausible



Interpretierbarkeit auszeichnen. Des Weiteren stehen die gewonnen Ergebnisse in starker Kongruenz zu den Beobachtungen des C<sub>6</sub>-NBD Sphingomyelinmetabolismus an metabolisch gelabelten HMEC-1. Ferner erfolgte eine Etablierung dieses quantitativen Analyseverfahrens anhand übereinstimmender Aussagen nach zellulärer CD95-Stimulation zu bereits publizierten Beobachtungen bei vergleichbarer Versuchsanordnung (Grassme, Jekle et al. 2001), (Gulbins 2003), (Fanzo, Lynch et al. 2003), (Grassme, Riehle et al. 2005).

Im wertenden Überblick stellt die Konfokalmikroskopie somit für die vorliegende Aufgabenstellung eine elegante Methode dar um bereits gewonnene Aussagen zur Dynamik der sSMPD1 auf fluoreszenzmikroskopischer Ebene zu hinterfragen, zu vergleichen sowie zu visualisieren.

#### **5.4. Endothelialer Sphingomyelinmetabolismus:**

##### **Dynamisches Verhalten von sSMPD1 und den Produkten im Inflammationsprozess**

Nach dem aktuellen wissenschaftlichen Stand ist die sezernierte Variante der SMPD1 die einzige Sphingomyelinase-Isoform, die für die extrazelluläre Hydrolyse des membranständigen Sphingomyelins zu Ceramid verantwortlich ist (Schissel, Keesler et al. 1998).

Da die sSMPD1 ihre enzymatische Aktivität bei einem pH-Wert von ~5,0 optimal entfaltet, scheint es zunächst unphysiologisch, diesem Enzym adäquate Wirkung im systemischen Blutkreislauf zuzuschreiben. Allerdings konnten Callahan et al. nachweisen, dass bei nahezu neutralem pH-Milieu, welches im Blutkreislauf vorzufinden ist (7,35-7,45), lediglich die Substrataffinität ( $k_m$ ) sinkt (Callahan, Jones et al. 1983), sich jedoch die Enzymaktivität dabei nicht ändert ( $V_{max}$ ) (Schissel, Jiang et al. 1998). Aufgrund des inhomogenen Lipidverteilungsmusters der Zellmembran mit resultierendem Substratüberschuss von Sphingomyelin an der Außenseite der HMEC-1-Membran (5-10:1) (Cremesti, Goni et al. 2002), ist davon auszugehen, dass die extrazellulär wirkende sSMPD1 sich in einem permanent aufgesättigten Zustand befindet. Somit scheint in unseren, durch neutrale pH-Einstellung geprägten *in vitro*-Zellversuchen, die verminderte sSMPD1-Substrataffinität keine signifikanten Limitationen zu bewirken. Letztendlich sind Ischämie- und Stressreaktionen im lokalen Rahmen auch teilweise durch Vorherrschen eines relativ sauren Milieus im Gewebe geprägt, wodurch begünstigte Reaktionsbedingungen für die sSMPD1 geschaffen werden.

Bei der dünnschichtchromatographischen Auswertung der endothelialen C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-Hydrolyseprodukte identifizierten wir neben dem unmittelbaren Spaltprodukt C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid ein zusätzliches C<sub>6</sub>-NBD-Sphingolipid. Beim Vergleich unserer DC-

Aufnahmen mit verschiedenen, den zellulären Sphingomyelinstoffwechsel betreffenden, wissenschaftlichen Arbeiten konnten wir die unbekannte Substanz mit großer Sicherheit als C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid (engl.: *glucosylceramide*) identifizieren (Babia, Ledesma et al. 2001) (Grazide, Terrisse et al. 2004) (van Helvoort, Giudici et al. 1997). Dieses Cerebrosid stellt ein primäres, direkt verstoffwechseltes Derivat von C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid im komplexen Sphingomyelinmetabolismus dar. Neben teilweise abundanten Vorkommen in einigen Zellmembrantypen verbunden mit wichtigen biophysikalischen Eigenschaften während Inflammation, wird diesem Produkt der Glykosylcerebrosid-Synthetase ebenfalls eine bedeutsame Rolle als *second messenger* in zellulären Signaltransduktionsprozessen zugesprochen (van Meer, Wolthoorn et al. 2003). Die bei dünnschichtchromatographischer Auswertung der HMEC-1-Stimulationsversuche nahezu vergleichbare quantitative Präsenz von Glykosylcerebrosid im Vergleich zu Ceramid ist ein Zeichen effizienter endothelialer Stoffwechselvorgänge. Somit scheinen auch komplexere, in den zellulären Sphingomyelinmetabolismus eingebundene Enzymkaskaden am Endothelzellmodell während eines Inflamationsprozesses eine bedeutsame funktionelle Rolle zu spielen. Viel entscheidender als die genaue Charakteristik oder Struktur des in der zusätzlichen DC-Bande detektierten Sphingolipids war für unsere Untersuchungen jedoch die begründete Annahme, dass sich diese Substanz aus der Vorläuferstruktur C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid ableitet und somit indirekt ein Produkt der SMPD1-abhängigen C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-Hydrolyse darstellt. Somit muss bei der Stoffmengenbestimmung von Glykosylcerebrosid ebenfalls im weitesten Sinne auf die extrazelluläre sSMPD1-Aktivität geschlossen werden. Aus diesem Grund betrachteten wir eine Bestimmung des von uns erfassbaren endothelialen C<sub>6</sub>-NBD-Gesamtceramidpools (C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid + C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid) als wichtig, um eine umfassende Einschätzung der hydrolytischen sSMPD1-Wirkung als Schrittmacherenzym zu sichern.

Neben der allgemeinen Erkenntnis, dass den meisten bioaktiven Sphingomyelinabkömmlingen, allen voran Ceramid, maßgebliche inflammatorische Bedeutung zukommt, bleibt jedoch die genaue Rolle und das spezielle Wirkungsprofil der einzelnen Ceramiderivate im Kontext zur Grunderkrankung weitestgehend unklar. Dessen ungeachtet scheinen diese komplexeren Sphingolipide, beispielsweise Ganglioside, Sphingosinphosphate sowie Glykosylcerebrosid, eine vergleichbar wichtige pathophysiologische Kompetenz im zellulären Entzündungsprozess darzustellen.

Vordergründig lieferte die Analyse der zeitlichen Reaktionsabläufe des HMEC-1-Sphingolipidmetabolismus interessante Eindrücke, die sich maßgeblich auf die nachfolgende Versuchsplanung auswirkten. Bereits nach einem Stimulationszeitraum von 15min konnte das Maximum der endothelialen C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidgenerierung detektiert werden, während nach 30min aufgrund zellulärer Stoffwechselprozesse die C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid-Stoffmenge bereits abnahm. Diese relativ zügig ablaufende C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelin-Hydrolyse liegt unserer Meinung nach größtenteils in der direkten Zugabe des Blutserums zu den Endothelzellen begründet. Die im Serum mehr oder weniger enthaltene sSMPD1 konnte somit unmittelbar und verzögerungsfrei an der Außenseite der Endothelzellmembran wirksam werden und für eine umgehende Ceramidgenerierung sorgen. Zusätzlich zur systemisch zirkulierenden sSMPD1 scheint aber auch die zelleigen sezernierte sSMPD1 binnen weniger Minuten nach proinflammatorischer Stimulation in den Extrazellarraum überzutreten und dort schnell enzymatische Aktivität zu entfalten (Grassme, Riehle et al. 2005) (Grassme, Jekle et al. 2001). Neben der zügigen C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidgenerierung setzt die Derivatisierung zu C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid leicht verzögert ein und erreicht maximale endotheliale Stoffmengen nach 30 Minuten, nachdem wiederum weitere zelluläre Stoffwechsel- und Abbauvorgänge wirken, bei deren genauerer Nachweis die eingesetzten Methoden auf ihre Grenzen stoßen. Der Aspekt der zeitlich versetzten C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid-Bildung ist insofern nachvollziehbar, als dass die intakte, aktivierte Endothelzelle auf ein vorbestehendes C<sub>6</sub>-NBD-Ceramidangebot angewiesen ist, um weitere Glykosylierungsschritte vollziehen zu können.

Anhand unseres HMEC-1-Modells konnten wir eindeutig nachweisen, dass die beschriebenen Prozesse der Ceramid- sowie vermuteten Glykosylcerebrosid-Bildung unter proinflammatorischen Bedingungen zwar nicht schneller, jedoch deutlich verstärkt ablaufen. Im Vergleich zu Untersuchungen mit 5%igem Kontrollserum bewirkte somit die Stimulation metabolisch markierter C<sub>6</sub>-NBD-SM-HMEC-1 mit 5%igem Patientenserum (schwere Sepsis) eine signifikant gesteigerte Hydrolyse des endothelialen C<sub>6</sub>-NBD-Sphingomyelins verbunden mit einer deutlich verstärkten Generierung von zellulärem C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid und C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosid. Diese Beobachtung führt zu der Erkenntnis, dass systemische Entzündungszustände, wie beispielsweise eine schwere Sepsis, welche sich durch verschiedene proinflammatorische Faktoren sowie durch gesteigerte sSMPD1-Serumaktivität auszeichnen, konkret am Endothel zu einem gesteigerten Sphingomyelinmetabolismus mit deutlich erhöhter Produktion von Ceramiden führen.

Es ist zusammenfassend zu erwähnen, dass es uns in den durchgeführten Stimulationsversuchen gelang, aufschlussreiche Aspekte des endothelialen Sphingomyelinmetabolismus aufzuzeigen. Bereits bekannte Beobachtungen bezüglich sSMPD1-Reaktionsdynamik konnten wir am Zellmodell der mittels Patientenserum (schwere Sepsis) stimulierten HMEC-1 bestätigen. Demnach gelang es uns konkret an einer in Frage kommenden Zielzelle eine positive Korrelation von sSMPD1-Serumaktivität und endothelialer Ceramidgenerierung zu beobachten. Somit konnte Wirkung und Dynamik dieses Enzyms, das phänomenologisch bereits in Patienten mit systemischer Inflammation beschrieben wurde, auf funktioneller Ebene am Endothelzellmodell verdeutlicht werden. Neben der Erkenntnis, dass Ceramid als *second messenger* maßgebliche proinflammatorische Funktionen vermittelt, entdeckten wir ferner Hinweise, welche weiteren, komplexen Sphingolipiden wie Glykosylcerebrosid ebenfalls eine bioaktive Rolle im Entzündungsgeschehen zuschreiben lässt.

### **5.5. Rafts: Endotheliale Membrandynamik nach proinflammatorischer Stimulation**

Die fluoreszenzmikroskopische Markierung und Betrachtung stimulierter Endothelzellen gewährte uns aufschlussreiche Einblicke in die zelluläre Membrandynamik während des Inflammationsprozesses. Dabei gelang es uns erstmalig, dezidierte Zellmembran-Reorganisationsprozesse verschiedener, gewählter Sphingolipide nach HMEC-1-Stimulation mit Patientenserum (schwere Sepsis) zu beschreiben. Gerade weil die von uns gewonnenen Ergebnisse mit bereits von anderen Forschungsgruppen postulierten Effekten in guter Kongruenz stehen, war es nicht unser primäres Ziel, den zellulären Sphingomyelinmetabolismus unter der Stimulation einzelner, selektiver proapoptotischer Reize zu erforschen (Gulbins und Grassme 2002), (Kilkus, Goswami et al. 2003), (Bollinger, Teichgraber et al. 2005). Vielmehr wählten wir für die von uns durchgeführten Endothelzell-Stimulationsversuche bewusst den Gebrauch von Patientenserum, welches sich je nach Krankheitsbild einerseits als variable Zusammenstellung verschiedenster proinflammatorischer Faktoren präsentiert und andererseits durch die erhöhte Aktivität der sSMPD1 gekennzeichnet ist. Durch diese Wahl lassen sich unserer Meinung nach die zellulären Entzündungsvorgänge der *in vitro* HMEC-1 in stark realitätsnaher Korrelation zu klinischen Pathomechanismen der systemischen Inflammation untersuchen.

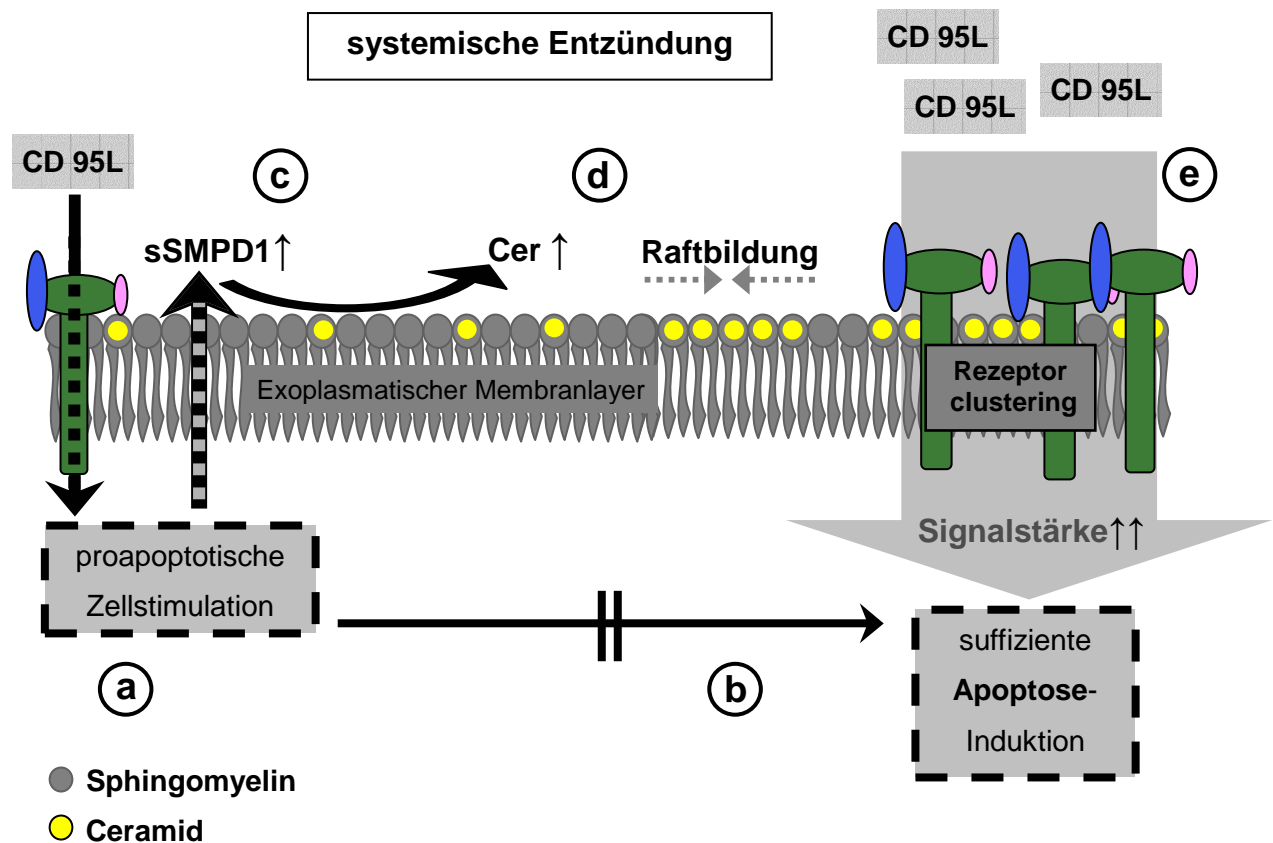
Mit Hilfe ausgewählter fluoreszierender Antikörper war es möglich, dynamische Strukturänderungen der Zellmembran nachzuweisen und die beobachteten Veränderungen in einem sinnvollen Zusammenhang zu den vorhergehenden Ergebnissen zu verknüpfen.

Unter Anwendung konfokalmikroskopischer Untersuchungen konnten wir mittels signifikant erhöhtem quantitativen Ceramid-Nachweis im Versuchsmodell stimulierter HMEC-1 (Patientenserum) die Hauptaussage der dünnschichtchromatographischen Analyse bestätigen. Zusätzlich wurde beim Analysieren der mit Patientenserum behandelten Zellen eine wesentliche Konzentrierung der ceramidreichen Membranareale zu einzelnen hochangereicherten Domänen sichtbar, welche unter anderem eine Größe von mehr als 20µm und somit einen beachtlichen Anteil der zellulären Oberfläche annehmen können (van Meer und Lisman 2002), (Hoekstra, Maier et al. 2003). Die von uns in Betracht gezogene Theorie der membranständigen Ceramid-Raftbildung haben wir durch den fluoreszenzmikroskopischen Vergleich mit einer in vielen Publikationen als Raftmarker bekannten Substanz Gangliosid-GM<sub>1</sub> untermauert (Kiyokawa, Baba et al. 2005), (Wustner 2007). GM<sub>1</sub> ist ein komplexes Ceramid-Derivat und reichert sich unseren Beobachtungen nach in typischen *raft*-Domänen, gehäuft am Endothelzellrand, an. Dort liegt bei vielen Endothel-, Epithel- und anderen Zellklassen mit flacher Morphologie die Umschlagsfalte der Zellmembran zwischen apikaler und basaler Membranseite. Zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion der gesuchten membranständigen Strukturen, wie zum Beispiel Ceramid oder GM<sub>1</sub> bietet sich demnach die Fokussierung der Zellränder besonders an, da eventuell irritierende Zellorganellen in diesen Bereichen wesentlich seltener anzutreffen sind. Interessanterweise kommt es während eines Inflammationsprozesses nicht zu einer eindeutigen Vermischung der beiden Sphingolipide GM<sub>1</sub> und Ceramid im Zellmembrankompartiment, sondern eher zu einer klar strukturierten Abgrenzung beider Lipide innerhalb der Membran. Konform zu diesen Beobachtungen erstellten bereits Kiyokawa et al. die Theorie, dass unterschiedliche Sphingolipide sich untereinander in einem flächendifferenzierten Zustand auf der Zellmembran darstellen (Kiyokawa, Baba et al. 2005).

Ein weiterer Punkt unserer Untersuchungen war die Fragestellung, ob das zellulär verstärkt vorherrschende Ceramid, welches als Resultat eines durch Entzündung aktivierten Sphingomyelinstoffwechsels zu deuten ist, durch die beobachtete *raft*-Formierung auch funktionelle Zelleffekte vermittelt. Mittels fluoreszenzmikroskopischen Nachweis einer ausgeprägten und signalintensiven Kollokalisierung von CD95-Rezeptoren innerhalb ceramidreicher *rafts*, erhärtet sich die Hypothese, dass sich bestimmte Todesrezeptoren, wie CD95, aufgrund von dynamischen Prozessen im Zellmembrankonstrukt assemblieren

(Cremesti, Paris et al. 2001). Wir konnten demnach am HMEC-1 Modell zeigen, dass mit Patientenserum (schwere Sepsis) stimulierte Endothelzellen ein deutliches Umverteilungsmuster des CD95-Rezeptors aufweisen, welches sich durch strukturierte Konzentrierung des Rezeptors mit signifikant erhöhter Rezeptordichte innerhalb verstärkt gebildeter Ceramid-Domänen charakterisiert. Zhang et al. beschrieben, dass einige äussere Reize und Signale erst dann für die Zelle suffizient übertragbar werden, wenn sich die entsprechenden, vorher vereinzelt auftretenden Rezeptoren in Membrandomänen assemblieren und konzentrieren (Zhang, Yi et al. 2007). Folglich ziehen wir die Schlussfolgerung, dass bei Patienten mit akuten systemischen Entzündungszuständen die verstärkte Bildung von Ceramid in Endothelzellen einen zellulären Effekt erzielt, indem dieses durch Formierung von *raft*-Strukturen als membranständige Plattform für das *clustering* bestimmter Rezeptortypen, wie CD95, fungiert (Abb. 23).

Weiterhin haben wir untersucht, ob das gebildete membranständige Ceramid als direktes Resultat der extrazellulär wirkenden sSMPD1 zu betrachten ist. Zunächst konnten wir anhand fluoreszenzmikroskopischer Analyse beobachten, dass bei proinflammatorisch (Patientenserum (schwere Sepsis)) stimulierten HMEC-1 deutlich vermehrt extrazelluläre saure Sphingomyelinase an der Zellmembran nachweisbar ist. Außerdem ist das Enzym zum allergrößten Anteil an den membranständigen Ceramid-*rafts* lokalisiert. Dementsprechend ist die gemeinsame Kolo-kalisation von Enzym und Enzymprodukt für uns ein zusätzlicher Hinweis, dass das *ad hoc* generierte Ceramid weitestgehend auf die extrazellulär wirksame sSMPD1 zurückzuführen ist. Entsprechende Effekte ließen sich bei durchgeführter 20minütiger Stimulationsdauer bei den mit Kontrollserum stimulierten HMEC-1 kaum oder nur spärlich beobachten.



**Abb. 23: Schematische Darstellung möglicher dynamischer Sphingomyelinmetabolismen bei proinflammatorischer Stimulation** (a) Bei systemischer Entzündung verstärkt auftretende Faktoren, wie CD95L bewirken auf die Endothelzelle durch Stimulation einzelner CD95-Rezeptoren eine proapoptische Aktivierung. (b) Das Potential der vermittelten Reize reicht zunächst nicht aus, um über zugehörige zelluläre Enzymkaskaden einen wirkungsvollen Zelluntergang zu initiieren. (c) Jedoch kann eine verstärkte autokrine sSMPD1-Sekretion in den Extrazellularraum beobachtet werden. (d) Die erhöhte sSMPD1-Aktivität bewirkt eine rasche, abundante Generierung von Ceramid, das sich zusammen mit Cholesterin durch Lateraldiffusion vor allem im äußeren Membrankompartiment der Zellmembran zu Ceramid-reichen *rafts* konzentriert. (e) Viele Rezeptoren, beispielsweise Todesrezeptoren wie CD95, haben die Eigenschaft, sich in solchen hochangereicherten Membrandomänen zu assemblieren und zu clustern. Aufgrund der erhöhten Rezeptordichte wird das durch CD95L wirkende Signal verstärkt und adäquat auf die Zelle übergeleitet, wodurch letztendlich Apoptose-vermittelnde Enzymkaskaden wirksam induziert werden können. Vereinfachtes Zellmembran-Schema. Zur besseren Übersicht wurde auf die Darstellung des intrazellulären Membranlayers sowie weiterer Zellmembrankomponenten, wie diverse Phospholipide, und Cholesterin verzichtet.

## 5.6. Endothelialer Sphingomyelinmetabolismus unter Einfluss verschiedener Inhibitoren

Es konnte deutlich gezeigt werden, dass bei einer *in vitro*-Simulation eines systemischen Entzündungsprozesses eine rasche sowie signifikant gesteigerte endotheliale Ceramidgenerierung zu beobachten ist. Zusätzlich lieferten wir fluoreszenzmikroskopische Anhaltspunkte, dass vermehrt produziertes Ceramid als direkte Konsequenz der erhöhten Aktivität der sSMPD1 anzusehen ist und innerhalb der Zellmembran durch

Umverteilungsprozesse während eines Entzündungsreizes proapoptotische Signalkaskaden initiieren und verstärken kann. Eine Modulation der abundanten Inflammations-assoziierten Sphingomyelinhydrolyse durch Hemmung der sezernierten Sphingomyelinase wäre ein früher und sinnvoller Ansatzpunkt, um nachfolgende zelluläre, Ceramid-induzierte Entzündungskaskaden abzuschwächen oder zu unterbinden. Die Inhibition der sSMPD1 lässt unserer Meinung nach einen zellprotektiven Effekt erwarten, sodass beispielsweise beim Patienten mit generalisierten und entgleisten Entzündungsprozessen eine drohende Endotheldysfunktion präventiv moduliert werden könnte. Unter diesem langfristig angestrebten Ziel haben wir zunächst methodische Überprüfungen des trizyklischen Antidepressivums Desipramin an HMEC-1 durchgeführt. An artifiziellen, Sphingomyelinreichen Membranen beschrieben Kölzer et al. bereits die inhibitorische Wirkung von Desipramin (Kolzer, Werth et al. 2004). Die SMPD1-Hemmwirkung beruht demnach nicht aufgrund kompetitiver Mechanismen, sondern in einer durch Desipramin verursachten räumlichen Trennung des Enzyms vom membranständigen Substrat. Weiterhin wird vermutet, dass trizyklische Antidepressiva den proteolytischen Abbau der sauren Sphingomyelinase verstärkt induzieren (Hurwitz, Ferlinz et al. 1994). Mittels dünnschichtchromatographischer Analyse zeigte sich in unserem *in vitro* Endothelzellmodell nach Desipramin-Inkubation eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der zellulären C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid- und C<sub>6</sub>-NBD-Glykosylcerebrosidgenerierung.

Auch bei Untersuchungen der sSMPD1-Hemmeffekte der synthetischen Substanz NB6 stellten wir eine konzentrationsabhängige zelluläre Ceramidabnahme fest, die sich aufgrund der Strukturverwandtschaft des Carbazol-Derivats zu trizyklischen Antidepressiva gegenüber der Wirkung von Desipramin als vergleichbar präsentiert. Weiterhin ist zu erwähnen, dass in unserer Arbeitsgruppe bei tierexperimentellen Versuchen mit endotoxingeschockten Mäusen durch NB6 ebenfalls ein deutlicher sSMPD1-hemmender Effekt dargestellt wurde (Claus, Bunck et al. 2005). Interessanterweise entwickelt sich die inhibitorische Wirkung von Desipramin und NB6 bei Untersuchungen des Patientenserums am Endothel geringfügig stärker als die entsprechende Wirkung der beschriebenen Hemmstoffe bei HMEC-1-Stimulation mit Kontrollserum. Dieser Effekt wird innerhalb der Patientengruppe durch eine stärkere, relative Abnahme der Sphingomyelinhydrolyseprodukte bei zunehmender Inhibitorkonzentration sichtbar. Möglicherweise könnte hierbei im Serum gesunder Kontrollpatienten eine veränderte Zusammensetzung endogener aktivierender Proteine vorherrschen, welche um die Bindungsstelle der Hemmstoffe konkurrieren und deren Wirkung dadurch beeinflussen. Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre die verstärkte Präsenz

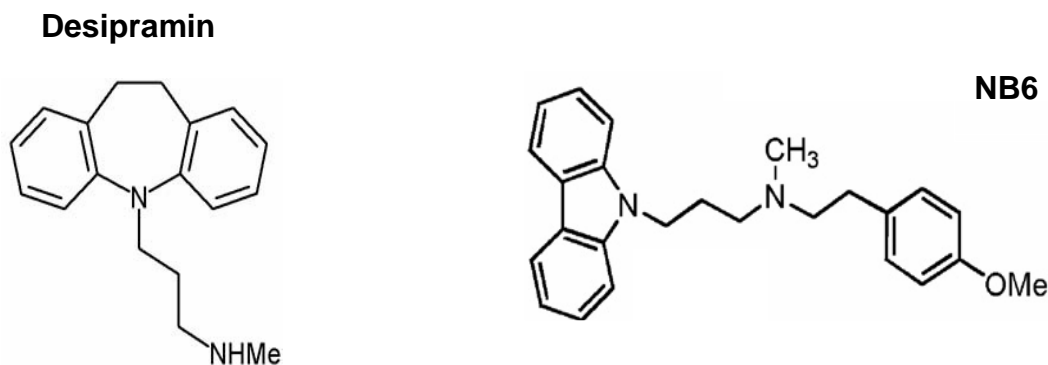


modifizierender Faktoren im Serum von Patienten mit schwerer Sepsis, die die zirkulierende sSMPD1 gegenüber inhibitorischen Einflüssen sensibilisiert. Beispielsweise gelten verschiedene, unter proinflammatorischem Stress verstärkt anfallende Oxidantien wie „reaktive oxidative Spezies“ ( $\cdot\text{O}^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder Peroxynitrite ( $\cdot\text{ONNO}^-$ ) als Induktoren der sauren Sphingomyelinase (Won und Singh 2006), (Castillo, Levy et al. 2007). Die aktivierenden Effekte werden dabei vermutlich durch oxidative Umwandlungen an C-terminalen Cysteingruppen des Enzyms erzielt (Qiu, Edmunds et al. 2003). Demzufolge ist es wiederum vorstellbar, dass eine strukturelle Beeinflussung der sSMPD1 sich auch auf die Interaktion mit inhibitorischen Substanzen wie trizyklische Antidepressiva oder NB6 auswirkt und deren Hemmwirkung verstärken könnte. Jedoch lag eine genauere Beantwortung dieser Fragestellung nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit und bedarf konkreter Nachforschungen.

Anhand unserer zweiten Methode, der konfokalmikroskopischen Fluoreszenzintensitätsanalyse, konnten wir ebenfalls eine signifikant erniedrigte endotheliale Ceramidentstehung nach Desipramin-Inkubation ( $40\mu\text{M}$ ) sowie NB6-Inkubation ( $40\mu\text{M}$ ) beobachten und somit die dünnschichtchromatographischen Ergebnisse bestätigen. Demzufolge bekräftigen wir einerseits die von Kölzer et al. initiierte Hypothese, dass Desipramin seine Hemmwirkung durch räumliche Distanzierung von Enzym und Substrat erzielt und übertragen diese Theorie auf NB6. Überraschenderweise blieb bei erwarteter und auch nachgewiesener Ceramidabnahme unter der Wirkung beider Hemmstoffe der quantitative fluoreszenzmikroskopische Nachweis der an der Zellmembran gebundenen sSMPD1 unverändert. Eine von uns vermutete Abnahme der Enzymmenge selbst bei höchstgewählter Inhibitorkonzentration ( $40\mu\text{M}$ ) wurde am Endothel nicht beobachtet. Da aber in allen unseren Untersuchungen auch bei hochkonzentrierter Hemmstoffzugabe das Enzym in unveränderter Quantität an der Zellmembran bindend nachgewiesen wurde, wäre, hypothetisch betrachtet, eine vollständige räumliche Trennung von sSMPD1 und Sphingomyelin durch die Inhibitoren eher unwahrscheinlich. Unserer Meinung nach könnte hierbei auch eine partielle Dislokation des Enzyms von der Zellmembran in Erwägung gezogen werden, wobei diesbezüglich keine experimentellen Daten erhoben wurden.

Wir konnten anhand der beschriebenen Inhibitorstudien somit zeigen, dass neben der bereits bekannten SMPD1-Hemmwirkung von Desipramin an künstlichen Membranen auch ein Effekt am *in vitro* HMEC-1-Modell nachzuweisen ist. Bezüglich der bereits erwähnten bedeutenden Rolle des aktivierten Sphingomyelinmetabolismus bei verschiedenen Entzündungsformen scheint deshalb eine Intervention im Sinne einer Hemmung der sauren

sezernierten Sphingomyelinase von vielversprechendem klinischem Interesse zu sein. Mit Desipramin untersuchten wir eine bereits als Pharmazeutikum etablierte Substanz, die mit verschiedenen unerwünschten Einflüssen auf vegetative Funktionen nicht nebenwirkungsfrei ist und deshalb in weiterführenden SMPD1-Hemmstudien obgleich der beobachteten Effektivität eine eher untergeordnete Rolle spielen wird. Auf der Suche nach adäquaten Inhibitoren der sauren sezernierten Sphingomyelinase könnten somit neue Strukturvarianten wie NB6 bei der ebenfalls entsprechend potenten Hemmwirkung suffiziente Vorschläge auf dem Weg hin zur eventuellen pharmakologischen Verwendung in der angewandten Medizin darstellen. Dazu benötigt es aber noch zahlreicher Studien bezüglich Effektivität, Verträglichkeit sowie Nebenwirkungen in weiterführenden Modellen wie beispielsweise in Tiermodellstudien.



**Abb. 24: Hemmstoffe der SMPD1**

Strukturformeln entnommen aus: „*Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes*“ (Delgado, Casas et al. 2006)

### 5.7. Differenzierung der sSMPD1-Wirkung mittels unspezifischer Inhibitoren

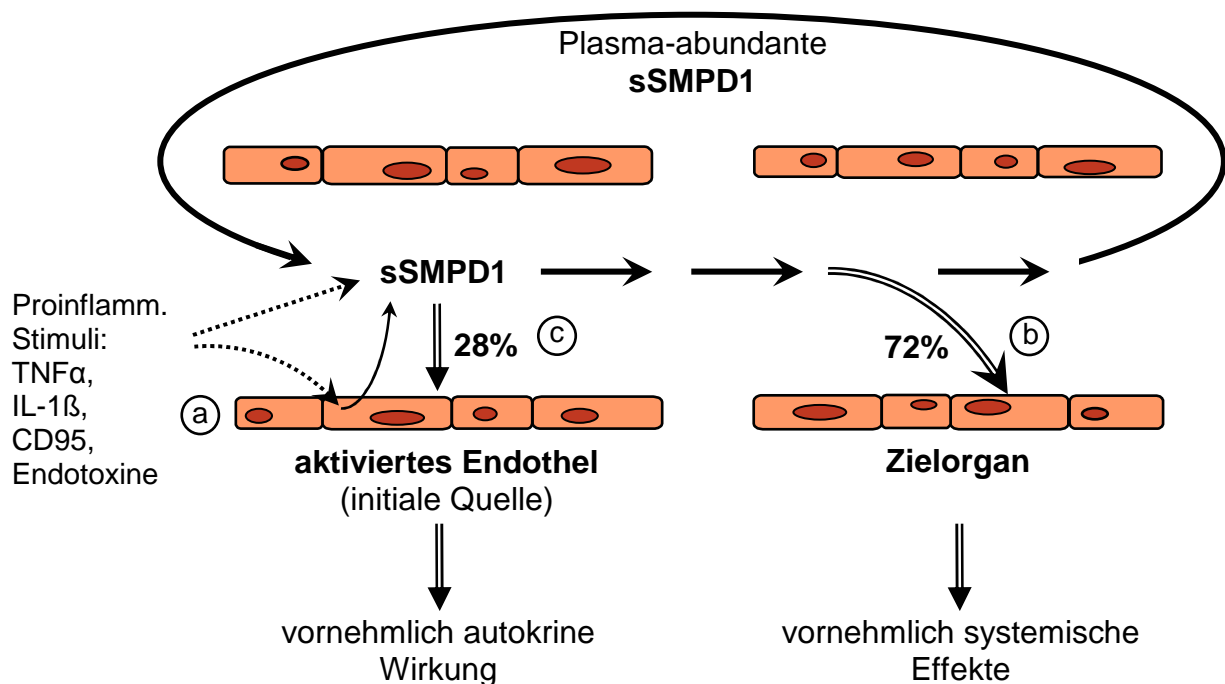
Neben gewonnenen Einblicken zu generellen und speziellen Einflüssen der erhöhten sSMPD1-Aktivität bei systemischer Entzündung war es ein wesentlicher Aspekt, die initiale Quelle des Enzyms zu untersuchen. Theoretisch betrachtet können im inflammatorisch aktivierten Organismus an einer einzelnen Endothelzelle zwei sSMPD1-Enzyme aus zweierlei Herkunft wirken (Abb. 25). Einerseits werden aufgrund gesteigert wirkender proinflammatorischer Zytokine zelluläre sSMPD1-Sekretionsmechanismen aktiviert, die in einer lokal erhöhten extrazellulären Enzymkonzentration münden. Die zunächst intrazellulär lokalisierte, saure sezernierte Sphingomyelinase wird dementsprechend auf einen entzündlichen Reiz hin ins äußere Kompartiment geschleust und kann beispielsweise an der

Zelle autokrin aktiv werden. Davon distanziert sollte man andererseits die Effekte an der Endothelzellmembran betrachten, die der bereits im Blut zirkulierenden sSMPD1 zuzuschreiben sind. Bei funktionellen Untersuchungen muriner SMPD1 konnte eine Halbwertszeit von 14h im reaktionsfreudigen, lysosomalen Milieu ermittelt werden (Newrzella und Stoffel 1996). Demgegenüber ist anhand milderer Bedingungen des Blutkreislaufs davon auszugehen, dass die dort prävalierende, strukturverwandte sSMPD1 ihre hydrolytische Aktivität über einen noch längeren Zeitraum entfalten kann. Aufgrund Proteolyse-protektiver Effekte, welche sich durch ein hochgradiges sSMPD1-Glykosylierungsmuster erklären lassen, scheint dabei die Halbwertszeit der Enzymwirkung im Blutkreislauf zumindest über viele Stunden anzuhalten. Demnach ist es vorstellbar, dass Produktions- und Wirkungsort der sSMPD1 weit voneinander entfernt liegen aber auch unmittelbar durch ein und die gleiche Zelle repräsentiert werden können. Bei der Bestimmung der Aktivität der sezernierten Sphingomyelinase sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass potentielle zelluläre sSMPD1-Endozytoseprozesse, welche vordergründig bei Inflammationszuständen beobachtet wurden, zu einer Beeinflussung der Enzymkonzentration im Serum führen können (Garcia-Ruiz, Mari et al. 2000). Laut Tabas et al. ist die zelluläre (Wieder)Aufnahme der sSMPD1 dabei ein Mechanismus, der zusätzlich zu einer erhöhten zellulären Ceramidgenerierung beitragen könnte (Tabas 1999) jedoch hypothetisch betrachtet die Lokalisierung des tatsächlichen Enzym-Ursprungs erschweren kann.

Anhand dieser theoretischen Überlegungen stellte sich die Frage, zu welchem Anteil die endotheliale Ceramidgenerierung auf lokalen, autokrinen Effekten der sezernierten Sphingomyelinase beruht, beziehungsweise welche Rolle das im Blutpool systemisch erhöhte Enzym dabei vermittelt. Durch Verwendung von Brefeldin A bei Stimulationsversuchen am HMEC-1-Modell war es möglich, die zelluläre Proteinsekretion in ihrer Gesamtheit zu unterbinden und auf diese Weise isoliert die Wirkung der im Serum enthaltenen sSMPD1 an der Endothelzelle zu betrachten. Anhand dünnenschichtchromatographischer Vergleiche bei identischen, BFA-freien Kontrollversuchen kamen wir zu der Erkenntnis, dass ein Großteil (72,2%) der endothelialen Sphingomyelinhydrolyse aus der Wirkung der im Serum enthaltenen sSMPD1 resultiert. Der durch Brefeldin A inhibierte Anteil der Ceramidgenerierung (27,8%) kann demnach als die nicht erfolgte Wirkung der lokal sezernierten sSMPD1 interpretiert werden.

Laut den Beobachtungen von Zeidan et al. resultiert eine Hemmung der Proteinkinase C- $\delta$  aufgrund unterbleibender Phosphorylierungsschritte in einer deutlich verminderten beziehungsweise komplett aufgehobenen zellulären sSMPD1-Sekretion (Zeidan und Hannun

2007). Unter Verwendung von Rottlerin (Mallotoxin), einer als potenten PKC- $\delta$ -Inhibitor beschriebenen Substanz, führten wir in Nebenbetrachtungen HMEC-1-Stimulationsversuche mit anschließender dünnschichtchromatographischer und konfokalmikroskopischer Auswertung durch. Die anhand von BFA-Experimenten gewonnene Aussage, welche der lokal sezernierten sSMPD1 nur einen geringen Anteil (27,8%) der endothelialen Sphingomyelinhydrolyse zuweist, konnte mittels durchgeführter Rottlerin-Versuche tendenziell bestätigt werden. Die Rottlerin-spezifischen Effekte vermittelten zwar eine nur moderat verringerte beziehungsweise unveränderte HMEC-1-Sphingomyelinhydrolyse, unterstreichen aber insofern die wesentliche Rolle der im Serum wirkenden sSMPD1 im Gegensatz zum autokrin sezernierten Enzym. Eventuell muss in diesem Zusammenhang auch die Wirksamkeit von Rottlerin oder im weiteren Zusammenhang der von Zeidan et al. beschriebene Einfluss der inhibierten Proteinkinase-C- $\delta$  auf sSMPD1-Sekretionsprozesse genauer hinterfragt und geprüft werden (Zeidan und Hannun 2007).



**Abb. 23: Differenzierung zwischen autokrin und systemisch wirkender sSMPD1**

(a) Systemische Entzündung beziehungsweise Sepsis charakterisiert sich einerseits in gesteigerter Präsenz proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oder Endotoxin, sowie andererseits in der systemisch erhöhten Aktivität der sezernierten sauren Sphingomyelinase im Serum. (b) Am humanen Endothel ist unseren Beobachtungen nach die Hydrolyse des membranständigen Sphingomyelins in ihrer Gesamtheit zu ca. 72% durch die Wirkung der im Blutkreislauf systemisch zirkulierenden sSMPD1 begründet. (c) Schätzungsweise 28% des endothelialen Sphingomyelin-Gesamtumsatzes ist dabei der autokrinen Wirkung der frisch lokal ins Blut sezernierten sSMPD1 zuzuschreiben, bevor sich diese ebenfalls in den zirkulierenden sSMPD-1-Pool integriert.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die bei systemischer Entzündung erhöht auftretenden Plasmakonzentrationen der sezernierten Isoform der sauren Sphingomyelinase (sSMPD1) hinsichtlich einer enzymatischen Wirkung an der extrazellulären Seite der Endothelzellmembran zu untersuchen. Die Erkenntnis, dass sSMPD1 beim generalisierten Entzündungsprozess nicht nur in gesteigerter Aktivität vorzufinden ist, sondern auch mit dem Verlauf und dem Schweregrad des Krankheitsbildes assoziiert ist, wird unter anderem anhand einer positiven Korrelation zu verschiedenen Entzündungsmarkern erkennbar. Mittels Durchführung und Verknüpfung dünnschichtchromatographischer sowie konfokalmikroskopischer Analyseverfahren, welche in unterschiedlichen Experimenten zum Tragen kamen, waren wir in der Lage, die von uns gestellte Hypothese eindeutig zu bestätigen. Zunächst konnten wir hierbei an humanen *in vitro* Endothelzellen (HMEC-1) aufzeigen, dass unter proinflammatorischen Bedingungen die sSMPD1 für eine extrazelluläre Hydrolyse des mit bis zu 85mol % in der äußeren Zellmembran abundanten Sphingomyelins primär verantwortlich ist. Unsere Beobachtungen erweitern dabei die bisherigen Kenntnisse über die beim kritisch kranken Patienten gesteigert vorherrschende sSMPD1-Aktivität, indem nunmehr eine konkrete, konzentrationsabhängige Wirkung des Enzyms am intakten, Infektort-fernen Endothelzellverband nachgewiesen werden konnte. Charakteristisch für die aufgrund des Inflammationsprozesses verstärkt im Blutkreislauf wirkende sezernierte Sphingomyelinase ist demnach eine deutlich gesteigerte endotheliale Ceramidgenerierung, welche zur Enzymaktivität positiv korreliert. Ceramid wiederum steht als primäres Hydrolyseprodukt der Sphingomyelinasen im Zentrum des vielschichtigen Sphingolipidstoffwechsels und erfüllt als bioaktiver Lipidmediator vor allem im Inflammationsprozeß entscheidende Funktionen in der Pathophysiologie der Zelle. Angesichts des hohen Vernetzungsgrades innerhalb der Sphingolipide scheinen aber noch zahlreiche weitere, komplexe Ceramiderivate an zellulären Entzündungskaskaden mitzuwirken. Beispielsweise identifizierten wir bei der Auswertung unserer HMEC-1-Stimulationsversuche mit großer Wahrscheinlichkeit mit Glykosylcerebrosid ein zusätzliches, sekundäres Sphingomyelinspaltprodukt, dem bei zellulärer Immunantwort ebenfalls relevante Funktionen zugeschrieben werden. Neben der direkten Initiierung proapoptotischer zellulärer Signalkaskaden in der Funktion eines *second messengers* scheint Ceramid ferner eine grundlegende Rolle bei der Bildung Zellmembran-ständiger *rafts* zu vermitteln. Im Zuge der konfokalmikroskopischen Betrachtungen gelang es, nach proinflammatorischer Stimulation

der HMEC-1 mit Patientenserum (schwere Sepsis), die gezielte Formierung solcher signalaktiver Ceramidareale in der Endothelzellmembran zu visualisieren. Darüber hinaus konnte nach Entzündungsreizen eine ausgeprägte Assemblierung des CD95-Todesrezeptors kolokalisiert zu den Ceramid-rafts beobachtet werden. Demgegenüber zeigten Kontrollexperimente, bei denen die HMEC-1 mit Serum gesunder Probanden inkubiert wurden, eine deutlich geringere Ceramidgenerierung mit kaum nachweisbarer raft-Formierung und nur marginal messbarem CD95-Rezeptor-clustering innerhalb der Membrandomänen. Da durch Rezeptor-Assemblierung in Membran-rafts der Effekt einer Signalamplifizierung beschrieben wird, sind oftmals erst durch diesen Prozess zelluläre Effektor-Kaskaden suffizient auslösbar. Bisher wurde dieses Phänomen größtenteils bei so genannten Todesrezeptoren beobachtet, sodass folglich die vermehrte Bildung von zellulären Ceramid-rafts in gesteigerter Apoptoserate münden kann.

Im Fokus unserer Versuche stand das humane Endothel, da dieses im Organismus das primäre Kontaktorgan gegenüber einer Vielzahl verschiedener, generalisierter Reize bildet und im Rahmen eines SIRS oder eines septischen Prozesses einer permanenten Stimulation mit drohender nachfolgender Dysfunktion unterliegt. Letztere hingegen steuert zu folgenschweren pathophysiologischen Prozessen wie der disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) mit erhöhter Neigung zu petechialen Blutungen sowie einer generalisierten Ödembildung oder Mikrozirkulationsstörungen bei. Diese können in ihrer Gesamtheit entscheidend zu einem vital bedrohlichen Vollbild einer schweren Sepsis, gefolgt vom Multiorganversagen, beitragen.

Aktiviertes Endothel fungiert als reichhaltige initiale Quelle der sezernierten Sphingomyelinase. Vor allem zelluläre Interaktionen mit proinflammatorischen Zytokinen werden als starke lokale Sekretionsreize der sSMPD1 beschrieben. Diesbezüglich entdeckten wir jedoch erstmals Hinweise, wonach das sezernierte Enzym die hydrolytische Wirkung nicht nur autokrin am Sekretionsort entfaltet, sondern vornehmlich Infektort-fern, also systemisch agiert. Theoretisch betrachtet wird somit der endotheliale Sphingomyelinabbau zu einem weitaus größeren Anteil durch die bereits im Serum präsente sSMPD1 katalysiert als durch das lokal sezernierte Enzym. Die beschriebenen Beobachtungen bilden laut unserer Meinung eine wesentliche Grundlage, die bei der Formulierung von Interventionsstrategien von Relevanz ist. Unserer Hypothese nach könnte beim therapeutischen Eingriff in den inflammatorischen Sphingomyelinmetabolismus beispielsweise eine systemische Inhibition der sezernierten Sphingomyelinase einen aussichtsreichen Ansatz darstellen, der in Verbindung mit Antizytokintherapien und kausalen Strategien, Erfolg verspricht. Aus diesem

Grund haben wir mit dem Ziel, zur klinischen Etablierung zukünftiger sSMPD1-Hemmstoffe beizutragen, die beiden spezifischen SMPD1-Inhibitoren Desipramin und NB6 an unserem Modell getestet. Durch Einsatz beider Substanzen an den Endothelzellen konnte einer erhöhten zellulären Ceramidproduktion, verbunden mit den dadurch initiierten Entzündungskaskaden signifikant entgegengewirkt werden.

Im wertenden Überblick lässt sich schlussfolgern, dass an humanen Endothelzellen eine direkte Verbindung zwischen systemisch erhöhtem Sphingomyelinmetabolismus bei Sepsis und konkreten zellulären Effekten besteht. Dieser beschriebene Zusammenhang konnte dabei in der vorliegenden Arbeit erstmals präsentiert werden. Inwieweit diese Effekte im Rahmen einer generalisierten Entzündungsreaktion an der Ausbildung einer Endotheldysfunktion beteiligt sind, ließ sich anhand unserer Methoden nicht nachweisen. Jedoch wurden erstmals Mechanismen aufgezeigt die einen Ansatz liefern, dass die im Blut in erhöhten Konzentrationen messbare, sezernierte Sphingomyelinase nicht nur ein Epiphänomen eines systemischen Inflamationsprozesses darstellt, sondern auch konkrete, proapoptotische Wirkung an Endothelzellen entfaltet.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ahmad, T. Y., A. L. Beaudet, et al. (1986). "Human lysosomal sphingomyelinase: substrate efficacy of apolipoprotein/sphingomyelin complexes." Biochemistry **25**(15): 4415-20.
- Anderson, K. I., J. Sanderson, et al. (2006). "A new configuration of the Zeiss LSM 510 for simultaneous optical separation of green and red fluorescent protein pairs." Cytometry A **69**(8): 920-9.
- Babia, T., M. D. Ledesma, et al. (2001). "Endocytosis of NBD-sphingolipids in neurons: exclusion from degradative compartments and transport to the Golgi complex." Traffic **2**(6): 395-405.
- Bauer, M. (2003). "[Early goal-directed therapy in sepsis. Old wine in new skins?]." Anaesthesist **52 Suppl 1**: S16-9.
- Bauer, M., F. Brunkhorst, et al. (2006). "[Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]." Anaesthesist **55**(8): 835-45.
- Billis, W., Z. Fuks, et al. (1998). "Signaling in and regulation of ionizing radiation-induced apoptosis in endothelial cells." Recent Prog Horm Res **53**: 85-92; discussion 93.
- Bollinger, C. R., V. Teichgraber, et al. (2005). "Ceramide-enriched membrane domains." Biochim Biophys Acta **1746**(3): 284-94.
- Brunkhorst, F. M., O. K. Eberhard, et al. (1999). "Discrimination of infectious and noninfectious causes of early acute respiratory distress syndrome by procalcitonin." Crit Care Med **27**(10): 2172-6.
- Callahan, J. W., C. S. Jones, et al. (1983). "The active site of lysosomal sphingomyelinase: evidence for the involvement of hydrophobic and ionic groups." J Neurosci Res **10**(2): 151-63.
- Castillo, S. S., M. Levy, et al. (2007). "Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells." Exp Cell Res **313**(12): 2680-6.
- Chatterjee, S. (1999). "Neutral sphingomyelinase: past, present and future." Chem Phys Lipids **102**(1-2): 79-96.
- Chawes, B. L., C. Rehnitz, et al. (2007). "[Procalcitonin for early diagnosis of bacteraemia in children with cancer]." Ugeskr Laeger **169**(2): 138-42.
- Cheng, Y., A. Nilsson, et al. (2002). "Purification, characterization, and expression of rat intestinal alkaline sphingomyelinase." J Lipid Res **43**(2): 316-24.
- Cifone, M. G., P. Roncaioli, et al. (1995). "Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal." Embo J **14**(23): 5859-68.



- Claus, R. A., A. C. Bunck, et al. (2005). "Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis." Faseb J **19**(12): 1719-21.
- Colell, A., A. Morales, et al. (2002). "Ceramide generated by acidic sphingomyelinase contributes to tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in human colon HT-29 cells through glycosphingolipids formation. Possible role of ganglioside GD3." FEBS Lett **526**(1-3): 135-41.
- Cortis, E. and A. Insalaco (2006). "Macrophage activation syndrome in juvenile idiopathic arthritis." Acta Paediatr Suppl **95**(452): 38-41.
- Cremersti, A., F. Paris, et al. (2001). "Ceramide enables fas to cap and kill." J Biol Chem **276**(26): 23954-61.
- Cremersti, A. E., F. M. Goni, et al. (2002). "Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome?" FEBS Lett **531**(1): 47-53.
- da Veiga Pereira, L., R. J. Desnick, et al. (1991). "Regional assignment of the human acid sphingomyelinase gene (SMPD1) by PCR analysis of somatic cell hybrids and in situ hybridization to 11p15.1----p15.4." Genomics **9**(2): 229-34.
- Delgado, A., J. Casas, et al. (2006). "Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes." Biochim Biophys Acta **1758**(12): 1957-77.
- Delogu, G., G. Famularo, et al. (1999). "Ceramide concentrations in septic patients: a possible marker of multiple organ dysfunction syndrome." Crit Care Med **27**(11): 2413-7.
- Dhainaut, J. F., S. B. Yan, et al. (2004). "Treatment effects of drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis with or without overt disseminated intravascular coagulation." J Thromb Haemost **2**(11): 1924-33.
- Doehner, W., A. C. Bunck, et al. (2007). "Secretory sphingomyelinase is upregulated in chronic heart failure: a second messenger system of immune activation relates to body composition, muscular functional capacity, and peripheral blood flow." Eur Heart J.
- Donaldson, J. G., D. Finazzi, et al. (1992). "Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein." Nature **360**(6402): 350-2.
- Drobnik, W., G. Liebisch, et al. (2003). "Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients." J Lipid Res **44**(4): 754-61.
- Fanzo, J. C., M. P. Lynch, et al. (2003). "CD95 rapidly clusters in cells of diverse origins." Cancer Biol Ther **2**(4): 392-5.
- Ferlinz, K., R. Hurwitz, et al. (1997). "Functional characterization of the N-glycosylation sites of human acid sphingomyelinase by site-directed mutagenesis." Eur J Biochem **243**(1-2): 511-7.

- Gabay, C. and I. Kushner (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." N Engl J Med **340**(6): 448-54.
- Garcia-Ruiz, C., M. Mari, et al. (2000). "Human placenta sphingomyelinase, an exogenous acidic pH-optimum sphingomyelinase, induces oxidative stress, glutathione depletion, and apoptosis in rat hepatocytes." Hepatology **32**(1): 56-65.
- Goggel, R., S. Winoto-Morbach, et al. (2004). "PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide." Nat Med **10**(2): 155-60.
- Goni, F. M. and A. Alonso (2002). "Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity." FEBS Lett **531**(1): 38-46.
- Gordesky, S. E. and G. V. Marinetti (1973). "The asymmetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane." Biochem Biophys Res Commun **50**(4): 1027-31.
- Grassme, H., A. Cremesti, et al. (2003). "Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation." Oncogene **22**(35): 5457-70.
- Grassme, H., A. Jekle, et al. (2001). "CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts." J Biol Chem **276**(23): 20589-96.
- Grassme, H., A. Riehle, et al. (2005). "Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms." J Biol Chem **280**(28): 26256-62.
- Grazide, S., A. D. Terrisse, et al. (2004). "Cytoprotective effect of glucosylceramide synthase inhibition against daunorubicin-induced apoptosis in human leukemic cell lines." J Biol Chem **279**(18): 18256-61.
- Grom, A. A. (2003). "Macrophage activation syndrome and reactive hemophagocytic lymphohistiocytosis: the same entities?" Curr Opin Rheumatol **15**(5): 587-90.
- Gulbins, E. (2003). "Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide." Pharmacol Res **47**(5): 393-9.
- Gulbins, E., S. Dreschers, et al. (2004). "Ceramide, membrane rafts and infections." J Mol Med **82**(6): 357-63.
- Gulbins, E. and H. Grassme (2002). "Ceramide and cell death receptor clustering." Biochim Biophys Acta **1585**(2-3): 139-45.
- Gulbins, E. and R. Kolesnick (2002). "Acid sphingomyelinase-derived ceramide signaling in apoptosis." Subcell Biochem **36**: 229-44.
- Gulbins, E. and P. L. Li (2006). "Physiological and pathophysiological aspects of ceramide." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **290**(1): R11-26.
- Hippenstiel, S. and N. Suttrop (2003). "Interaction of pathogens with the endothelium." Thromb Haemost **89**(1): 18-24.

- Hoekstra, D., O. Maier, et al. (2003). "Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids." J Lipid Res **44**(5): 869-77.
- Hurwitz, R., K. Ferlinz, et al. (1994). "The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts." Biol Chem Hoppe Seyler **375**(7): 447-50.
- Jaffrezou, J. P., J. M. Herbert, et al. (1991). "Reversal of multidrug resistance by calcium channel blocker SR33557 without photoaffinity labeling of P-glycoprotein." J Biol Chem **266**(29): 19858-64.
- Janka, G. E. (2007). "Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis." Eur J Pediatr **166**(2): 95-109.
- Kajimoto, T., Y. Shirai, et al. (2004). "Ceramide-induced apoptosis by translocation, phosphorylation, and activation of protein kinase Cdelta in the Golgi complex." J Biol Chem **279**(13): 12668-76.
- Kilkus, J., R. Goswami, et al. (2003). "Ceramide in rafts (detergent-insoluble fraction) mediates cell death in neurotumor cell lines." J Neurosci Res **72**(1): 65-75.
- Kiyokawa, E., T. Baba, et al. (2005). "Spatial and functional heterogeneity of sphingolipid-rich membrane domains." J Biol Chem **280**(25): 24072-84.
- Klausner, R. D., J. G. Donaldson, et al. (1992). "Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure." J Cell Biol **116**(5): 1071-80.
- Klein, A., M. Henseler, et al. (1994). "Sphingolipid activator protein D (sap-D) stimulates the lysosomal degradation of ceramide in vivo." Biochem Biophys Res Commun **200**(3): 1440-8.
- Kolesnick, R. N. (1987). "1,2-Diacylglycerols but not phorbol esters stimulate sphingomyelin hydrolysis in GH3 pituitary cells." J Biol Chem **262**(35): 16759-62.
- Kolodny, E. H. (2000). "Niemann-Pick disease." Curr Opin Hematol **7**(1): 48-52.
- Kolzer, M., N. Werth, et al. (2004). "Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine." FEBS Lett **559**(1-3): 96-8.
- Kortgen, A., P. Niederprum, et al. (2006). "Implementation of an evidence-based "standard operating procedure" and outcome in septic shock." Crit Care Med **34**(4): 943-9.
- Lang, P. A., M. Schenck, et al. (2007). "Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide." Nat Med **13**(2): 164-70.
- Lansmann, S., C. G. Schuette, et al. (2003). "Human acid sphingomyelinase." Eur J Biochem **270**(6): 1076-88.
- Leipelt, M., D. Warnecke, et al. (2001). "Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosphingolipids in animals, plants, and fungi." J Biol Chem **276**(36): 33621-9.

- Levy, M. M., M. P. Fink, et al. (2003). "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference." Crit Care Med **31**(4): 1250-6.
- Lightle, S., R. Tosheva, et al. (2003). "Elevation of ceramide in serum lipoproteins during acute phase response in humans and mice: role of serine-palmitoyl transferase." Arch Biochem Biophys **419**(2): 120-8.
- Linke, T., G. Wilkening, et al. (2001). "Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins." Biol Chem **382**(2): 283-90.
- Liu, B., L. M. Obeid, et al. (1997). "Sphingomyelinases in cell regulation." Semin Cell Dev Biol **8**(3): 311-322.
- Llacuna, L., M. Mari, et al. (2006). "Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury." Hepatology **44**(3): 561-72.
- Loidl, A., R. Claus, et al. (2004). "Role of ceramide in activation of stress-associated MAP kinases by minimally modified LDL in vascular smooth muscle cells." Biochim Biophys Acta **1690**(2): 150-8.
- Marathe, S., S. L. Schissel, et al. (1998). "Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling." J Biol Chem **273**(7): 4081-8.
- Memon, R. A., W. M. Holleran, et al. (2001). "Regulation of sphingolipid and glycosphingolipid metabolism in extrahepatic tissues by endotoxin." J Lipid Res **42**(3): 452-9.
- Nebenfuhr, A., C. Ritzenthaler, et al. (2002). "Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion." Plant Physiol **130**(3): 1102-8.
- Newrzella, D. and W. Stoffel (1996). "Functional analysis of the glycosylation of murine acid sphingomyelinase." J Biol Chem **271**(50): 32089-95.
- Ni, X. and C. R. Morales (2006). "The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor." Traffic **7**(7): 889-902.
- Nilsson, A. and R. D. Duan (2006). "Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin." J Lipid Res **47**(1): 154-71.
- Okazaki, T., A. Bielawska, et al. (1994). "Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation." J Biol Chem **269**(6): 4070-7.
- Qiu, H., T. Edmunds, et al. (2003). "Activation of human acid sphingomyelinase through modification or deletion of C-terminal cysteine." J Biol Chem **278**(35): 32744-52.
- Ravelli, A. (2002). "Macrophage activation syndrome." Curr Opin Rheumatol **14**(5): 548-52.

- Rey, C., M. Los Arcos, et al. (2007). "Procalcitonin and C-reactive protein as markers of systemic inflammatory response syndrome severity in critically ill children." Intensive Care Med **33**(3): 477-84.
- Samet, D. and Y. Barenholz (1999). "Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells." Chem Phys Lipids **102**(1-2): 65-77.
- Schissel, S. L., X. Jiang, et al. (1998). "Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development." J Biol Chem **273**(5): 2738-46.
- Schissel, S. L., G. A. Keesler, et al. (1998). "The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene." J Biol Chem **273**(29): 18250-9.
- Schissel, S. L., E. H. Schuchman, et al. (1996). "Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene." J Biol Chem **271**(31): 18431-6.
- Schuchman, E. H. (2007). "The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease." J Inherit Metab Dis.
- Schutze, S., K. Potthoff, et al. (1992). "TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown." Cell **71**(5): 765-76.
- Shi, H., H. W. Wang, et al. (2006). "[Macrophage activation syndrome in children with systemic onset juvenile idiopathic arthritis: analysis of 13 patients]." Zhonghua Er Ke Za Zhi **44**(11): 812-7.
- Simonaro, C. M., J. H. Park, et al. (2006). "Imprinting at the SMPD1 locus: implications for acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease." Am J Hum Genet **78**(5): 865-70.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Sreedharan, A., S. Bowyer, et al. (2006). "Macrophage activation syndrome and other systemic inflammatory conditions after BMT." Bone Marrow Transplant **37**(7): 629-34.
- Tabas, I. (1999). "Secretory sphingomyelinase." Chem Phys Lipids **102**(1-2): 123-30.
- Tani, M., M. Ito, et al. (2007). "Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space." Cell Signal **19**(2): 229-37.
- Vallee, B. L. and D. S. Auld (1990). "Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins." Biochemistry **29**(24): 5647-59.
- van der Bijl, P., M. Lopes-Cardozo, et al. (1996). "Sorting of newly synthesized galactosphingolipids to the two surface domains of epithelial cells." J Cell Biol **132**(5): 813-21.

van Helvoort, A., M. L. Giudici, et al. (1997). "Transport of sphingomyelin to the cell surface is inhibited by brefeldin A and in mitosis, where C6-NBD-sphingomyelin is translocated across the plasma membrane by a multidrug transporter activity." J Cell Sci **110** ( Pt 1): 75-83.

van Meer, G. and Q. Lisman (2002). "Sphingolipid transport: rafts and translocators." J Biol Chem **277**(29): 25855-8.

van Meer, G. and W. van 't Hof (1993). "Epithelial sphingolipid sorting is insensitive to reorganization of the Golgi by nocodazole, but is abolished by monensin in MDCK cells and by brefeldin A in Caco-2 cells." J Cell Sci **104** ( Pt 3): 833-42.

van Meer, G., J. Wolthoorn, et al. (2003). "The fate and function of glycosphingolipid glucosylceramide." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1433): 869-73.

Weisshart, K., V. Jungel, et al. (2004). "The LSM 510 META - ConfoCor 2 system: an integrated imaging and spectroscopic platform for single-molecule detection." Curr Pharm Biotechnol **5**(2): 135-54.

Wilkening, G., T. Linke, et al. (1998). "Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators." J Biol Chem **273**(46): 30271-8.

Won, J. S. and I. Singh (2006). "Sphingolipid signaling and redox regulation." Free Radic Biol Med **40**(11): 1875-88.

Wong, M. L., B. Xie, et al. (2000). "Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo: a possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8681-6.

Wustner, D. (2007). "Plasma membrane sterol distribution resembles the surface topography of living cells." Mol Biol Cell **18**(1): 211-28.

Zabielski, P., M. Baranowski, et al. (2007). "Partial hepatectomy activates production of the pro-mitotic intermediates of the sphingomyelin signal transduction pathway in the rat liver." Prostaglandins Other Lipid Mediat **83**(4): 277-84.

Zeidan, Y. H. and Y. A. Hannun (2007). "Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation." J Biol Chem **282**(15): 11549-61.

Zhang, A. Y., F. Yi, et al. (2007). "Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells." Antioxid Redox Signal **9**(7): 817-28.

Zhang, A. Y., F. Yi, et al. (2006). "Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells." Hypertension **47**(1): 74-80.

## Anhang

Statistische Parameter der in Abb. 17 dargestellten Messwerte

		SMPD1-Intensität (rE)			Cer-Intensität in (rE)		
Gruppe	Fallzahl (n)	Median	Q <sub>25%</sub>	Q <sub>75%</sub>	Median	Q <sub>25%</sub>	Q <sub>75%</sub>
1	17	19,1	14,7	24,7	4,1	3,0	5,7
2	12	19,2	15,9	21,9	2,5	1,9	2,9
3	15	18,8	16,8	21,2	3,0	2,4	3,7
4	13	13,3	12,3	14,3	1,9	1,6	2,6

**Ergebnisse der Arbeit wurden zu Teilen veröffentlicht und präsentiert:**

**Poster und Vorträge:**

Bunck AC, Hupe D, Dorer M, Acht B, Brunkhorst FM, Deigner HP, Claus RA: “Breakdown of sphingomyelin by secreted sphingomyelinase and formation of enriched microdomains in patients with systemic inflammation and organ failure”. 3<sup>rd</sup> International Congress Sepsis and Multiorgan Dysfunction, Weimar, 05.09-08.09.2007; *Infection* **35** (Suppl. II.), 14, 2007.

Hupe D: „Extrazelluläre Sphingolipidhydrolyse bei Inflammation“; Tag der Nachwuchswissenschaftler, 25.06.2007 Forschungszentrum Lobeda (FZL), FSU Jena

Bunck AC, Hupe D, Dorer M, Zacharias M, Brunkhorst FM, Deigner HP, Claus RA: “Extracellular hydrolysis of sphingomyelin in patients with systemic inflammation and organ failure” 3<sup>rd</sup> Cell Stress Society International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine and 2<sup>nd</sup> World Conference of stress, Budapest, (Hungary), 23.08.-26.08.2007

Claus RA, Bunck AC, Hupe D, Dorer M, Brunkhorst FM, Deigner HP: “Extracellular hydrolysis of sphingomyelin in patients with systemic inflammation and organ failure.” 7<sup>th</sup> World Congress Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis TSIS 2007, München, 13.03.-17.03.2007; *Inflamm. Res.* **56** (Suppl. 2) S186 [A262], 2007

Zacharias M, Bunck AC, Hupe D, Blaess M, Bockmeyer Cl, Lösche W, Deigner HP, Winning J, Spangenberg P, Claus RA: “Modulation of ceramide pattern by inhibition of secreted sphingomyelinase.” 4<sup>th</sup> IZKF Symposium on Future Perspectives in Biomedicine, Münster, 09.11.-11.11.2005



## **Danksagung**

Herrn Prof. Michael Bauer danke ich für die freundliche Unterstützung im Rahmen meines Promtionsvorhabens, insbesondere für die Beratung bei klinischen Fragestellungen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Ralf Claus für die exzellente Betreuung während meiner experimentellen Tätigkeit sowie bei der Anfertigung der Dissertation.

Weiterhin möchte ich Dr. rer. nat. Volker Oberle für die äußerst hilfreichen Ratschläge bezüglich Anfertigung mikroskopischer Präparate und gegebenen Hilfestellungen bei allen Fragen zur Mikroskopiertechnik danken.

Ein weiterer Dank gilt PD Dr. med. Wolfgang Lösche, Matthias Sieber und Maik Sossdorf für die freundliche Unterstützung bei allen generellen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Für die stets konstruktive Hilfeleistung allgemeiner labortechnischer Probleme sowie Beratung bei der Vorbereitung und Durchführung experimenteller Versuche danke ich Frau Brigitte Specht und insbesondere Frau Edith Walther.

Ein spezieller Dank gilt dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) an der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die Gewährung eines Promotionsstipendiums zur Förderung der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit.

Für die Nutzung des Laser Scanning Mikroskop LSM 510 meta<sup>®</sup> bedanke ich mich bei der AG Experimentelle Neurologie unter Leitung von Prof. Dr. Otto W. Witte, insbesondere bei Dr. rer. nat. Silke Keiner für die freundliche Hilfe bei speziellen technischen Fragestellungen.

# Curriculum vitae

Daniel Hupe

geboren am 17. Juli 1981 in Leinefelde

## ärztliche Tätigkeit

01/09 (vorauss.)      Beginn der praktischen Tätigkeit als Assistenzarzt

## Ausbildung

10/03 -10/08      Hauptstudium der Humanmedizin an der FSU Jena  
09/03              Ärztliche Vorprüfung, Jena  
seit 10/01        Grundstudium der Humanmedizin an der FSU Jena  
  
11/00 - 09/01      Grundwehrdienst: Beobachtungsartilleriebataillon 131 Mühlhausen  
09/92 - 06/00      Besuch des „St. Josef Gymnasium Dingelstädt“, Abitur  
09/88 - 06/92      Besuch der Grundschule in Küllstedt/Büttstedt

## Praktische Ausbildung

04/07 - 03/08      Praktisches Jahr in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
am Universitätsklinikum Jena, in der Klinik für Innere Medizin  
(Gastroenterologie und Kardiologie) des Eichsfeldklinikums in Worbis,  
in der Klinik für Allgemein- und Unfallchirurgie des Eichsfeldklinikums  
in Heiligenstadt/Reifenstein  
  
09/05 - 10/05      Famulatur in einer Praxis für Chirurgie/Sportmedizin, Heiligenstadt  
08/05 - 09/05      Famulatur in der Klinik für Transplantationschirurgie am Klinikum der  
Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz  
  
03/05 - 04/05      Famulatur in der Klinik für Allgemeinchirurgie, Mühlhausen  
08/04 - 09/04      Famulatur in einer Praxis für Chirurgie/Sportmedizin, Heiligenstadt

## Förderung und Auszeichnungen

10/06 - 03/07      Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für klinische  
Forschung (IZKF) im Rahmen der Nachwuchsforschung der FSU Jena

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel,  
persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der  
Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. rer. nat. Ralf Claus, Prof. M. Bauer,  
Dr. rer. nat. Volker Oberle, PD Dr. med. W. Lösche,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder  
unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im  
Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere  
wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht  
bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 20.12.2007

.....

Unterschrift des Verfassers

